Aus dem Medizinischen Zentrum für Infektion, Entzündung und Immunität / Aus dem Institut für Immunologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Stefan Bauer

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

In Zusammenarbeit mit dem
Institut für Experimentelle Immunologie des Universitätsklinikums Bonn
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Christian Kurts

Titel der Dissertation:

Der Einfluss von Rottlerin auf T-Zellpräsentation und -aktivierung

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Lukas Heineck aus Berlin

Marburg 2019

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
17. Oktober 2019

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Die vorliegende Arbeit wurde an den Instituten für Molekulare Medizin und Experimentelle Immunologie am Universitätsklinikum Bonn angefertigt.

Dekan:	Prof. Dr. Helmut Schäfer Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie Philipps-Universität Marburg
Referent:	Prof. Dr. Stefan Bauer / Prof. Dr. Christian Kurts Institut für Immunologie / Institut für Experimentelle Immunologie Philipps-Universität Marburg / Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
1. Korreferent:	Prof. Dr. Andreas Burchert Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Immunologie Philipps-Universität Marburg / UKGM

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
1.1 Das Immunsystem 1
1.2 Das angeborene Immunsystem 1
1.3 Das erworbene Immunsystem 2
1.4 Antigenpräsentation 3
1.4.1 Präsentationswege 4
1.5 T-Zellaktivierung 6
1.6 T-Zelleffektorfunktionen 9
1.6.1 Mechanismus der Zellzerstörung 9
1.6.2 T-Zellregulation und -toleranz 11
1.7 Autoimmunität 13
1.7.1 Genetische Faktoren 14
1.7.2 Epigenetische Faktoren 14
1.7.3 Autoimmunität und Infektionen 14
1.7.4 Autoimmunerkrankungen 15
1.7.5 T-Zellvermittelte Autoimmunität anhand des Beispiels Glomerulonephritis 16
1.7.6 T-Zellvermittelte Autoimmunität anhand des Beispiels T1D 16

2. Zielsetzung der Doktorarbeit 20

3. Material und Methoden 21
3.1 Material 21
3.1.1 Verwendete Geräte 21
3.1.2 Software 22
3.1.3 Chemikalien und Reagenzien 22
3.1.4 Antikörper 24
3.1.5 Mauslinien 25
3.1.6 Puffer 25
3.2 Methoden 28

4. Ergebnisse 36
4.1 Rottlerin inhibiert die Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen und folglich die T-Zellaktivierung *in vitro*. 36
4.2 Rottlerin blockiert direkt die T-Zellaktivierung und hat zudem einen negativen Effekt bei der BM-DC vermittelten T-Zellaktivierung *in vitro*. 42
4.3: Testung und Etablierung von verschiedenen Tierkrankheitsmodellen für den späteren Einsatz von Rottlerin *in vivo* 45
4.3.1: Rottlerin als möglicher Inhibitor der OVA-spezifischen Zytotoxizität und der Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen *in vivo* 45
4.3.2: Möglicher regulatorischer Effekt von Rottlerin in einem Tiermodell des post-operativen Ileus 47
4.3.3: Induktion eines akuten Leberversagens bei OT-I-Mäusen mittels Adenovirus als mögliches Modell zur Rottlerin-Anwendung 48
4.3.4: Induktion einer nephrotoxischen Nephritis mittels nephrotoxischem Scharfserum als mögliches Modell zur Rottlerin-Anwendung 49
4.3.5: Diabetische Entwicklung in RIP-mOVA-Mäusen nach Injektion von OT-I-Zellen als mögliches Modell zur Rottlerin-Anwendung 51

5. Diskussion 53
5.1 Rottlerin inhibiert die Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen und folglich die Aktivierung von T-Zellen *in vitro* 54

5.2 Rottlerin blockiert die T-Zellaktivierung auch auf T-Zellebene und hat zudem einen negativen Effekt bei der BM-DC vermittelten T-Zellaktivierung *in vitro*....56
5.3 Mögliche *in vivo* Relevanz von Rottlerin in verschiedenen Tiermodellen....57
5.3.1: Rottlerin als möglicher Inhibitor für die OVA-spezifische Zytotoxizität und die Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen *in vivo*....57
5.3.2 Mögliche immunologische Relevanz von Rottlerin auf verschiedene *in vivo*-Krankheitsmodelle....59
5.4 Weiterer Ausblick und Kontroverse von Rottlerin....63
5.4.1 Weitere Krankheitsmodelle....64
5.4.2 Humane Versuche....65
5.4.3 Rottlerin als Immunsuppressivum bei einer Transplantation....65
5.4.4 *In vitro* und *in vivo* Spezifität von Rottlerin auf die Proteinkinase C δ....66

6. Zusammenfassung....68

7. Literaturverzeichnis....69

8. Anhang....77
8.1 Abbildungsverzeichnis....77
8.2 Abbkürzungverzeichnis....78
8.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen....82
8.4 Lebenslauf....83
8.5 Danksagung....84

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Zum Schutz vor Krankheitserregern nutzt der Körper verschiedene Effektorzellen und Moleküle, die zusammen das Immunsystem bilden. Das Immunsystem hilft dem Körper auch allergene Substanzen zu eliminieren. Wird das Immunsystem durch eindringende Pathogene, Toxine oder Allergene aktiviert, stellt die Fähigkeit des Immunsystems zwischen Fremd- und Eigenmaterial zu unterscheiden, die wichtigste Grundlage zum Schutz des Organismus dar. Die Immunzellen sind dabei nicht nur in lymphoiden Organen wie Knochenmark, Thymus, Lymphknoten und Milz lokalisiert, sondern verteilen sich auf den ganzen Körper (Nicholson 2016).
Das Immunsystem teilt sich in zwei Arme auf, welche bezogen auf Reaktionsgeschwindigkeit und –spezifität klassifiziert werden. Diese werden angeborene (innate) und erworbene (adaptive) Immunantwort genannt (Chaplin 2010).

1.2 Das angeborene Immunsystem

Das innate Immunsystem ist ein evolutionär-konserviertes System, welches die erste Abwehr gegen eindringende mikrobielle Pathogene oder andere potentiale Gefahren für den Körper bildet. Die angeborene Immunität nutzt dabei physikalische, chemische und mikrobiologische Barrieren, sowie verschiedene Effektorzellen und Moleküle (unter anderem Neutrophile, Monozyten, Makrophagen und das Komplementsystem), die für die initiale Immunabwehr verantwortlich sind (Abbildung 1.1) (Sperandio, Fischer et al. 2015). Pathogen-Erkennungsmuster (PAMP) der Krankheitserreger werden durch verschiedene Mustererkennungsrezeptoren (PRR) auf Immunzellen erkannt und lösen eine nachgeschaltete Immunreaktion aus, die Krankheitserreger bereits nach wenigen Minuten bis Stunden bekämpfen kann (Amarante-Mendes, Adjemian et al. 2018). Die PRR stellen nicht rekombinante und eher unspezifische Rezeptoren dar, welche nur eine allgemeine Mustererkennung konservierter Strukturen zulassen (Turvey and

Broide 2010). Werden die Pathogene im Rahmen der angeborenen Immunität nicht eliminiert, wird das adaptive Immunsystem relevant, welches zeitgleich mit der innaten Immunantwort aktiviert wird, bis zur vollständigen Aktivierung aber eine Latenzphase von mehreren Tagen benötigt. Makrophagen und dendritische Zellen (DC) dienen als Signalgeber zwischen angeborener und erworbener Immunität.

1.3 Das erworbene Immunsystem

Die adaptive Immunantwort setzt sich aus einer antigen-spezifischen Reaktion durch T- und/oder B-Lymphozyten, zusammen (Abbildung 1.1). Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem erlangen die Zellen des erworbenen Immunsystem durch Rezeptoren, welche durch zufällige somatische Gensegmentwechsel generiert werden, eine einzigartige Spezifität (klonal) (Turvey and Broide 2010). Damit kann das erworbene Immunsystem nicht nur zwischen Selbst/Fremd unterscheiden, sondern kann auch zwischen verschiedenen Erregertypen differenzieren. Durch die geringe Anzahl an Zellen mit hoher Spezifität für jedes einzelne Pathogen müssen sich die Zellen nach Kontakt vermehren, um eine ausreichende Anzahl für eine effektive Antwort zu bilden (von Boehmer, Teh et al. 1989, Chaplin 2010).

Unmittelbar nach einer Infektion werden naive T- und/oder B-Lymphozyten für die zellvermittelte oder humorale Antwort aktiviert. Die volle Antwort und die Erlangung der Effektorfunktion der jeweiligen Zelle entwickeln sich jedoch erst knapp 5 bis 10 Tage später, abhängig von den pathogenen Substanzen, da sich die Lymphozyten wie oben beschrieben jedoch zunächst in reife Zellen mit Effektorfunktion differenzieren und vermehren müssen (Turvey and Broide 2010). Die humorale Antwort besteht aus B-Zellen, welche Antikörper (AK) zur Inaktivierung und Zerstörung von extrazellulären Mikroorganismen produzieren oder Virusinfektionen durch Blockade viraler Komponenten bekämpft. Im Gegensatz dazu steht die zellvermittelte Antwort, die nach Differenzierung von T-Zellen in unterschiedliche Subtypen für die Bekämpfung von intrazellulären Erregern und Tumorzellen verantwortlich ist. $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen (CTL) sind im Rahmen der zellvermittelten Antwort in der Lage entartete oder infizierte Körperzellen anhand von Peptid/MHC („*Major Histocompatibilty Complex*“)-Strukturen auf der Zelloberfläche zu identifizieren und diese zu eliminieren. $CD4^+$-T-Zellen differenzieren in sogenannte Helferzellen (T_H)

und regulieren sowohl die humorale als auch die zellvermittelte Antwort. Die Aktivierung der hier beschriebenen humoralen und zellvermittelten Immunantworten wird durch sogenannte Antigen-präsentierende Zellen (APC) reguliert, welche Antigene auf MHC-Komplexen an T-Lymphozyten präsentieren.

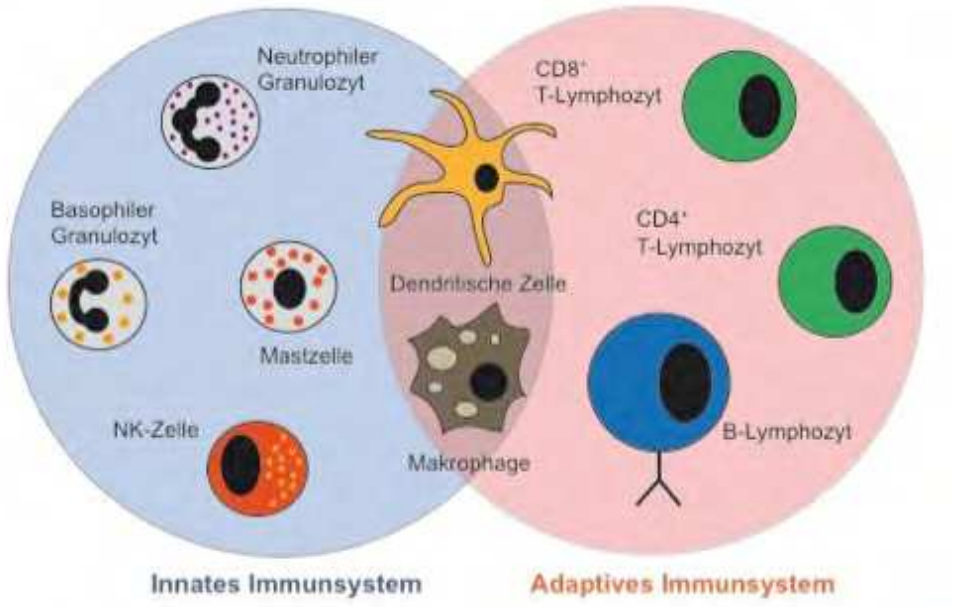


Abbildung 1.1: Übersicht der Zellen des innaten und adaptiven Immunsystems. Die innate Immunabwehr setzt sich aus Zellen des linken Kreises zusammen und die adaptive Immunabwehr aus Zellen des rechten Kreises. Makrophagen und dendritische Zellen können beide Funktionen erfüllen und dienen als Bindeglied beider Abwehrsysteme. Modifiziert nach: Dranoff, Cytokines in cancer pathogenesis, Nature Reviews Cancer, 2004.

1.4 Antigenpräsentation

Vorrausetzung für eine T-Zellaktivierung ist die Antigenpräsentation durch eine APC. Alle kernhaltigen Zellen des Körpers zerlegen stetig einen geringen Anteil ihrer Proteine und beladen mit den entstandenen Peptidfragmenten intrazelluläre MHC-Klasse-I-Moleküle, die auf die Zelloberfläche transportiert werden. Die MHC-I-Peptidkomplexe werden von $CD8^+$-T-Zellen mithilfe ihres T-Zell-Rezeptors (TZR) erkannt. Die T-Zellaktivierung muss daher streng reguliert sein, da größtenteils Selbstantigene präsentiert werden. Eine Aktivierung von T-Zellen welche spezifisch für Selbstantigene sind, würde zu Autoimmunerkrankungen führen (L 2013).

Antigen-präsentierende Zellen (APC) (besonders Dendritische Zellen) haben einen komplexen Mechanismus zur Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von Antigenen entwickelt. Dabei spielt der Ursprung des Antigens – entweder lokalisiert in der Zelle oder extrazellulär – eine bedeutsame Rolle. Dieser entscheidet, welcher Signalweg innerhalb der Zelle genutzt wird um das Antigen zu präsentieren. Prinzipiell werden endogene Antigene über MHC-Klasse-I-Moleküle naiven $CD8^+$-T-Zellen präsentiert, während extrazelluläre Antigene, welche von der Zelle aufgenommen wurden, über MHC-Klasse-II-Moleküle den naiven $CD4^+$-T-Zellen präsentiert werden. Es existiert noch ein zusätzlicher Signalweg, in dem extrazelluläre Antigene über MHC-Klasse-I-Moleküle den $CD8^+$-T-Zellen präsentiert werden. Dieser wird Kreuz-Präsentation genannt (Pardo, Buferne et al. 2003).

1.4.1 Präsentationswege

Exogener Signalweg. Peptide von extrazellulären Antigenen oder toxischen Agenzien, aufgenommen von der APC über Pinozytose, Phagozytose oder Rezeptor-vermittelte Endozytose, werden verarbeitet und mit MHC-Klasse-II-Molekülen auf die Zelloberfläche transportiert, um dort $CD4^+$-T-Zellen präsentiert zu werden. Alle drei Prozesse nehmen Flüssigkeit oder gelöste Bestandteile mittels umschließender Membranausläufer in Form von Vesikeln in die Zelle auf. Die Verarbeitung der Peptide stellt sich wie folgt dar: Die in die Zelle aufgenommenen Antigene werden in pH-neutralen Vesikeln transportiert. Diese wiederum fusionieren mit angesäuerten Vesikeln. Diese enthalten spezielle proteolytische Enzyme (z.B. saure Protease), die bei niedrigem pH aktiv sind und letztendlich die Proteinantigene spalten. Die Beladung der MHC-II-Komplexe mit den degradierten Antigenen erfolgt in den fusionierten Vesikeln. An der Zelloberfläche wird der Peptid-MHC-II-Komplex den $CD4^+$-T-Zellen präsentiert, welche sich dann im Kontext des Milieus aus Zytokinen zu bestimmten T-Helferzellen differenzieren. Einerseits unterstützen diese die Immunantwort bei der Aktivierung mikrobizider Enzyme von Makrophagen (T_H1), andererseits die Induktion von B-Zellen zur Produktion von IgG (Immunglobulin G)-Antikörpern zur Opsonisierung von extrazellulären Pathogenen für die Aufnahme durch phagozytierende Zellen (T_H2).

Endogener Signalweg. Peptide, welche aus intrazellulären Antigenen verarbeitet worden, werden auf MHC-I-Komplexe (innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums) geladen und dann zur Zelloberfläche zur Präsentation transferiert. Naive $CD8^+$-T-Zellen können MHC-I-angebotene Antigen-Peptide erkennen und somit zu zytotoxischen T-Zellen ausgebildet werden, welche die infizierten Zielzellen eliminieren.

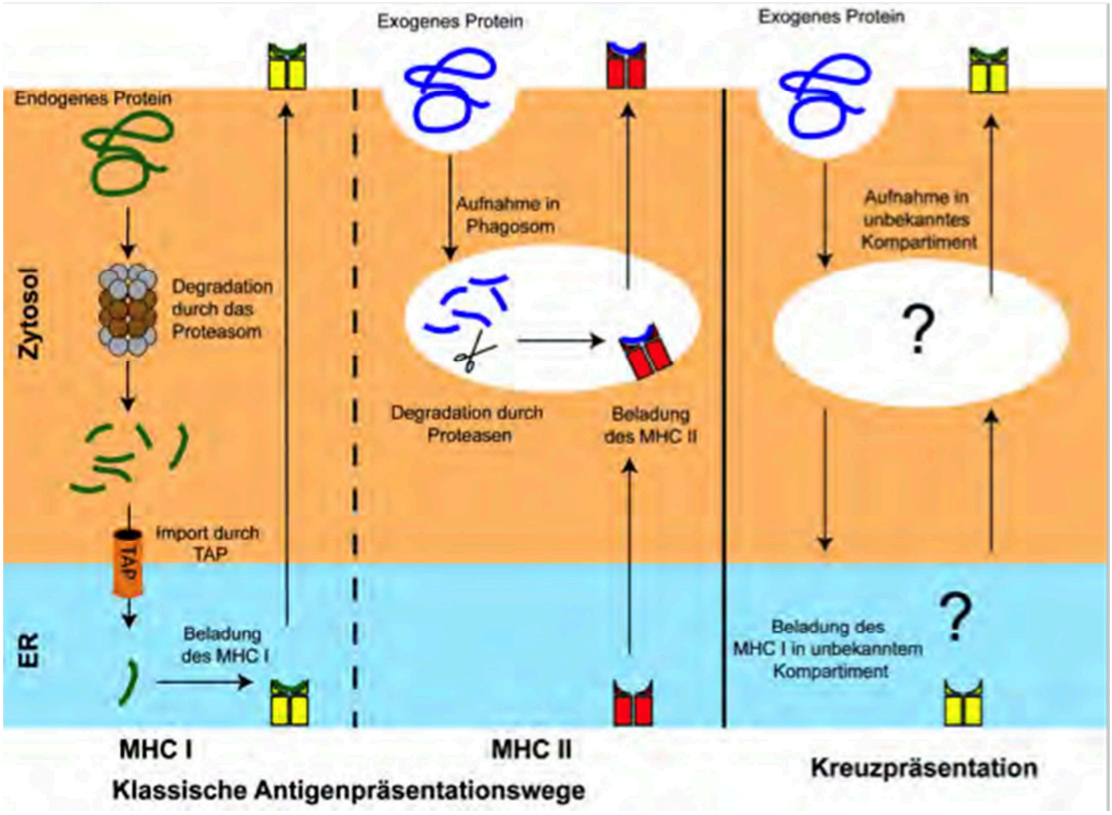


Abbildung 1.2: Antigenpräsentationswege. (I) Endogenes Antigen wird durch ein Proteasom in Peptid-Fragmente degradiert und dann über einen TAP-Transporter in das endoplasmatische Retikulum überführt. Eine Beladung des Peptids auf ein dort lokalisiertes MHC-Klasse-I-Molekül erfolgt. Der MHC-I-Peptid-Komplex wird durch den Golgi Apparat (GA) zur Zelloberfläche geschleust und $CD8^+$-T-Zellen präsentiert. (II) Die Endozytose von exogenem Antigen überführt dieses in lysosomale Zellkompartimente zur Degradation. Die degradierten Antigenfragmente werden in Vesikel verpackt, welche MHC-Klasse-II-Moleküle enthalten und diese als Bindungspartner nutzen. Die Vesikel fusionieren mit der Zellmembran und sorgen für die Präsentation der Peptide über MHC-II auf der Zelloberfläche für $CD4^+$-T-Zellen. (III) Eine andere Variante nutzt Teile von exogenem und endogenem Weg. Dabei wird angenommen, dass endozytiertes Antigen zu frühen Endosomen befördert und später für die proteasomale Spaltung im Zytoplasma freigegeben wird. Nun folgt das Peptid dem MHC-I-Signalweg und wird $CD8^+$-T-Zellen präsentiert. Modifiziert nach: Heath et al., Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance, Nature Reviews Immunology, 2001.

Kreuz-Präsentation. Entartete oder infizierte Zellen können nicht direkt von naiven $CD8^+$-T-Zellen erkannt und eliminiert werden. Zunächst müssen diese durch APC aktiviert werden, um zu zytotoxischen $CD8^+$-T-Effektorzellen zu differenzieren. Sind die APC jedoch nicht direkt infiziert, können diese exogene Antigene von Krankheitserregern oder Tumorzellen aufnehmen und präsentieren diese über MHC-Klasse-I-Moleküle den naiven $CD8^+$-T-Zellen. Exogene Antigene werden dabei aus den endosomalen Kompartimenten in das Zytosol verlagert zur Degradation durch das Proteasom. Der weitere molekulare Verlauf wie die degradierten Antigene den Endosomen und Phagosomen zugeführt werden, ist noch unklar (Joffre, Segura et al. 2012). Dieser bisher noch nicht vollständig charakterisierte Mechanismus wird Kreuz-Präsentation genannt. Der Prozess, welcher zur Aktivierung von $CD8^+$-T-Zellen und folglich zur Differenzierung in $CD8^+$-T-Effektorzellen führt, wird „*Cross-priming*“ bezeichnet (Bevan 1976).

1.5 T-Zellaktivierung

Voraussetzung der T-Zellaktivierung. Die Präsentation von Peptid/MHC-Komplexen an $CD8^+$-T-Zellen durch eine APC reicht alleine nicht für die Aktivierung der T-Zelle aus (Signal 1). Mindestens zwei weitere Signale werden benötigt um die Aktivierung der T-Zelle und die initiale Differenzierung in eine zytotoxische T-Effektorzelle zu gewährleisten: DC-Lizenzierung (Signal 0), Interaktion von kostimulatorischen Molekülen der APC und der T-Zelle (Signal 2) und die Sekretion von diversen Chemokinen und Zytokinen (Signal 3).

DC-Aktivierung und -Lizenzierung. Pathogen-vermittelte Antigene sind meistens mit Gefahrensignalen (PAMP) verbunden, die von Toll-Like-Rezeptoren (TLR) auf der DC-Oberfläche erkannt werden können. Diese Signale können molekulare Muster von Mikrobakterien oder Toxinen sein. Diese TLR-Agonisten, sowie die Interaktion von CD40L auf der Oberfläche von $CD4^+$-T_H-Zellen mit CD40 auf der DC überführen die DC in einen Status, der es ihr ermöglicht, naive $CD8^+$-T-Zelle ausreichend für eine zytotoxische Effektorfunktion zu programmieren. Dieser Vorgang wird DC-Lizenzierung genannt (Kurts, Robinson et al. 2010).

MHC-Peptid-Komplexerkennung durch den TZR. APC präsentieren MHC-Peptid-Komplexe auf der Zelloberfläche. T-Zellen erkennen das an den

MHC-Komplex gebundene Antigen-Peptid und interagieren mit diesem Peptid, um ihre Effektorfunktion zu erlangen. Die Oberflächenmoleküle CD4 oder CD8 der T-Zelle dienen als Korezeptor und stabilisieren die Bindung des TZR zum MHC-Komplex.

Kostimulation. Ein zweites Signal wird zur Stimulation der klonalen Expansion und vollständigen Aktivierung der naiven T-Zelle benötigt. Die DC-Lizensierung bewirkt die Hochregulation eigener kostimulatorischer Moleküle wie CD80/CD86 oder CD70, welche mit den T-Zelloberflächenmolekülen CD28 oder CD27 interagieren. Eine Signalkaskade mittels Interaktion einer Vielzahl von intrazellulären Molekülen innerhalb der T-Zelle schließt sich an, löst die Differenzierung von naiver zu zytotoxischer T- oder T-Helferzelle aus und startet die Transkription des Zytokins IL-2 (Interleukin-2), welches für die Proliferation von T-Zellen benötigt wird. Beim Ausbleiben der Interaktion zwischen den kostimulatorischen Molekülen stoppt die Proliferation der T-Zellen und die Funktionalität wird eingeschränkt (Beyersdorf, Kerkau et al. 2015).

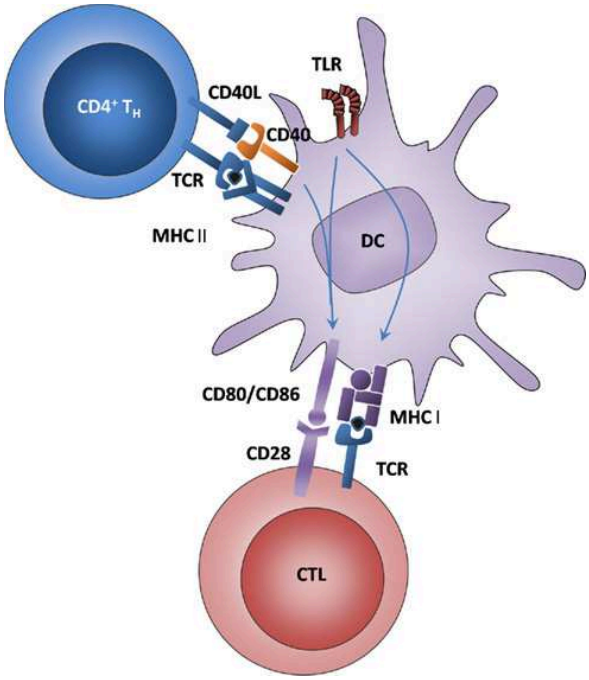


Abbildung 1.3: CTL-Programmierung und DC-Lizenzierung. Antigenpeptide, welche extrazellulären Antigenen entstammen, werden über die MHC-I- und MHC-II-Signalwege verarbeitet und den TZR von $CD4^+$-T_H-Zellen und $CD8^+$-T-Zellen präsentiert. Die kostimulatorischen Moleküle CD80/86 und CD70 der kreuz-präsentierenden DC werden verstärkt durch TLR-Agonisten und den CD40-Liganden, produziert von der T_H-Zelle. Die kostimulatorischen Moleküle interagieren mit CD28 und CD27 auf der $CD8^+$-T-Zelle und leiten die klonale Expansion der aktiverten $CD8^+$-T-Zelle ein. Ein Gegenregulationsmechanismus stellt die Hochregulation von PDL1 („Programmed death ligand" 1) auf einer APC dar, welcher die T-Zellproliferation reduziert und zur T-Zelltoleranz führt. Modifiziert nach: Kurts, 2011, Frontier Immunology, Review article.

Sekretion von Chemokinen und Zytokinen. Neben TZR- (Signal 1) und kostimulatorischen Signal (Signal 2) wird ein Zytokin-Signal benötigt um eine T-Zelldifferenzierung auszulösen (Signal 3). Das dritte Signal dient nicht nur der unterschiedlichen phänotypischen und funktionalen Ausprägung der T-Zellen, sondern umfasst Zytokine, die während der Differenzierung die Polarisation steuern (T_H1/T_H2), Zytokinen, welche naive T-Zellen zur DC locken und Zytokinen, welche von aktivierten T-Zellen produziert werden. Lizensierte DC und aktivierte T-Helferzellen sekretieren zudem Chemokine wie CCL-3, 4, 5, 17 und 22 um T-Zellen für deren Aktivierung in lymphoide Organe anzulocken und die autokrine IL-2 Produktion von T-Zellen zu gewährleisten (Krummel, Bartumeus et al. 2016). Dafür haben T-Zellen verschiedene Chemokinrezeptoren wie CCR4, CCR5 und die Zytokinrezeptoren wie IL-2R und IL-4R. Die

Immunantwort kann noch verstärkt werden durch die Aktivierung von Makrophagen und der Hochregulation von MHC-I und MHC-II mittels IFN (Interferon)-γ, Lymphotoxin und TNF (Tumornekrosefaktor)-α, welche von T_H1-Zellen generiert werden.

Aktivierte T-Zellen. Nach Abschluss der Aktivierung durch Erhalt aller Signale differenzieren sich die naiven T-Zellen zu verschiedenen T-Zelleffektorsubpopulationen, welche eine gezielte Rolle bei der Immunabwehr einnehmen und gegebenenfalls an eine Infektionsstelle wandern können (Krummel, Bartumeus et al. 2016).

1.6 T-Zelleffektorfunktionen

1.6.1 Mechanismus der Zellzerstörung

Pathogene (z.B. Viren) haben evolutionär Strategien entwickelt um die angeborene Immunantwort zu überwinden und ihre Ausbreitung sicherzustellen. Zum Beispiel kann die Immunüberwachung durch die Veränderung des Antigens oder eine zeitweilige Latenz des Pathogens umgangen werden. Die adaptive Immunität stellt dabei eine deutlich größere Hürde dar. Durch die Spezifität an Antigenrezeptoren können mögliche Erreger besser erkannt und dessen Eliminierung eingeleitet werden. Beispielsweise stellen CTL die primären Zellen zur Bekämpfung von Tumorzellen und viralen Infektionen dar. Viren dringen entweder durch Endozytose oder mit Hilfe viraler Hilfsproteine in Wirtszellen ein und starten dort die Vervielfältigung viraler Proteine mit Hilfe von Enzymen der Wirtszelle. Die viralen Proteine können wie jedes andere intrazelluläre Protein von den APC wahrgenommen und gespalten werden, um letztendlich als Peptide auf MHC-I-Moleküle beladen zu werden. Die Präsentation an der Zelloberfläche erfolgt dann zu naiven $CD8^+$-T-Zellen, welche bisher keine Funktion ausgeübt haben (Albert, Sauter et al. 1998). Diese differenzieren nach Kontakt mit der APC zunächst in zytotoxische T-Zellen, welche bei infizierten Zellen, die virale Proteinfragmente präsentieren, die Apoptose induzieren. Dabei tritt ein auf der T-Zelloberfläche befindlicher Fas-Ligand (FasL) mit einem Fas-Rezeptor der Zielzelle in Kontakt und startet in dieser eine intrazelluläre Todeskaskade (Abbildung 1.4). Zusätzlich entlässt die CTL Perforine und Granzyme, um die Zellmembran der befallenen Zelle zu permeabiliseren.

Granzym B leitet indirekt über einen Caspase-abhängigen Signalweg den DNA-Abbau der infizierten Zelle und somit die Apoptose ein. Des weiteren kann intrazelluläres Material ausströmen und die Apoptose der Zielzelle vorantreiben. Die CTL überlebt den Prozess und kann weitere Zielzellen eliminieren.

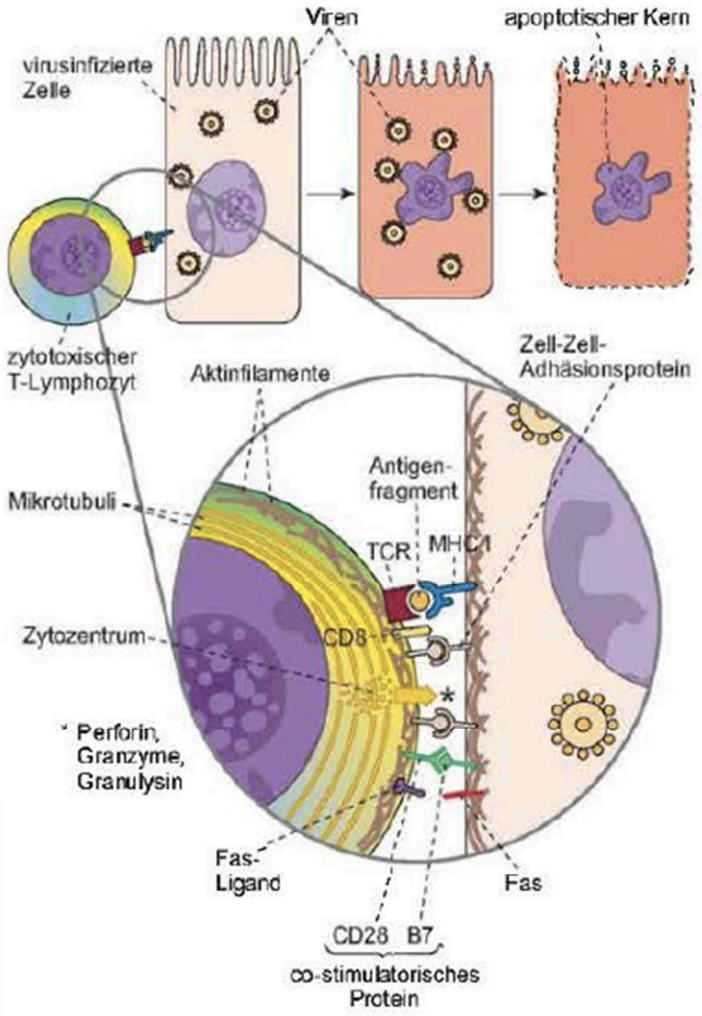


Abbildung 1.4: Elimination von Zielzellen durch eine zytotoxische T-Zelle. Die CTL erkennt mithilfe des TZR das auf der Oberfläche der infizierten Zelle präsentierte Antigenfragment, welches MHC-I-gebunden vorliegt. Zusätzlich wirken Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle zur Stabilisierung der Bindung. Der Fas-Ligand der CTL interagiert mit dem Fas-Rezeptor auf der Zielzelle, gleichzeitig werden Perforine und Granzyme aus der CTL entlassen, um die Zellmembran der Zielzelle zu permeabiliseren. Die Fas-Kaskade und Granzyme leiten die Zielzelle in die Apoptose, Zellmaterial wird in den Extrazellulärraum entlassen und die Zelle wird gänzlich abgetötet. Welsch, Lehrbuch Histologie, 3. Auflage, Abb. 6.10, S. 232.

1.6.2 T-Zellregulation und -toleranz

Die Eliminierung eines Pathogens kann auch mit einer Schädigung von körpereigenen Gewebe einhergehen, daher muss der Prozess der Immunantwort engmaschig reguliert werden, um eine Schädigung zu minimieren oder wenn möglich zu unterbinden. Die lokale Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-4, IL-10 und TGF („*Tumor growth factor*“)-β, sowie Prostaglandinen und Kortikosteroiden unterdrückt die Progression der Immunantwort. Ebenfalls können Zytokine zu Beginn proinflammatorisch (z.B. IFN-γ, IL-10 und TNF-β), in einer späteren Phase der Immunreaktion antiinflammatorisch wirken und somit die Funktion aktivierter T-Zelleffektorzellen blockieren (Falcone, Yeung et al. 1999).
Andererseits können auch autoreaktive T-Zellen entstehen, welche körpereigenes Material als fremd erkennen. Während der T-Zellentwicklung entsteht das riesige TZR-Repertoire durch die zufällige genetische Rekombination, Trennung und erneute Zusammensetzung von verschiedenen DNA-Segmenten, die für die Antigenbindungsstelle kodieren (Sperandio, Fischer et al. 2015). Um die gesamte Bandbreite an Pathogenen zu erkennen, werden daher über 10^8 T-Zell-Rezeptoren gebildet (Wooldridge, Ekeruche-Makinde et al. 2012). T-Zellen werden im Thymus gebildet und dort auf ihre Affinität zu körpereigenen Proteinen getestet. Bei hoher Affinität werden diese autoreaktiven Zellen inaktiviert und in die Apoptose getrieben (zentrale Toleranz) (Abbildung 1.5). Gelingt es den autoreaktiven Zellen sich diesem Mechanismus zu entziehen, werden sie in der Peripherie durch fehlende Stimulation und regulatorische Zellen in ihrer Funktion limitiert (Periphere Toleranz) (Ohashi 2002).

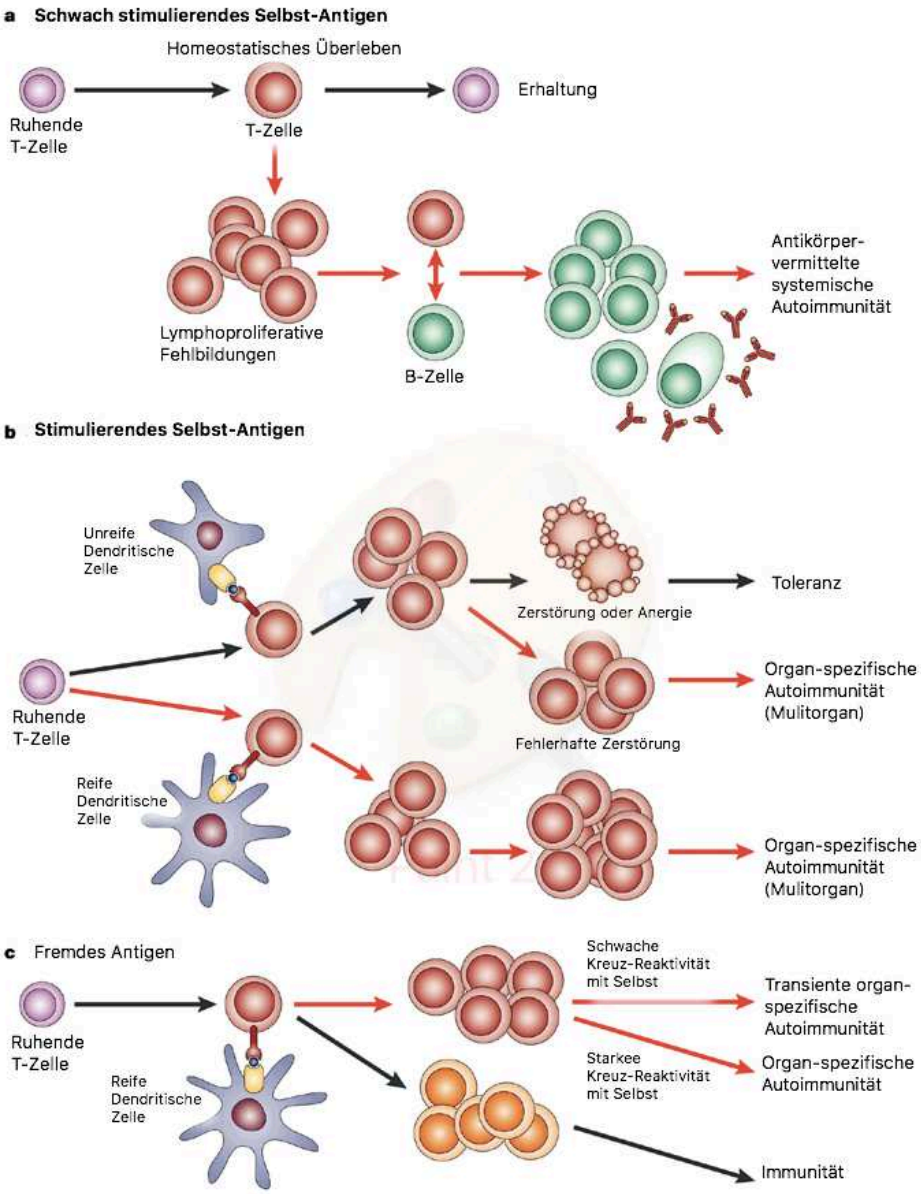


Abbildung 1.5: T-Zellsignalkaskade und Autoimmunität. Der physiologische Signalweg der T-Zelle wird durch schwarze Pfeile dargestellt, während pathologische Prozesse, die zur Autoimmunität führen können, durch rote Pfeile markiert werden. Modifiziert nach: (I) Obashi, Nature Reviews Immunology 2, 427-438 (Juni 2002).

Durch eine strenge Regulation der T-Zellaktivierung werden gegen sich selbst gerichtete (autoimmune) Prozesse unterbunden, die sonst zur Destruktion von nicht infizierten Zellen mittels autoreaktiver CTL oder indirekt mittels autoreaktiver T-Helferzellen führen könnten. Kommt es jedoch zu Fehlern in der Selbst-Toleranz können Autoimmunkrankheiten wie zum Beispiel Hashimoto-Thyreoiditis, bei der autoreaktive T-Zellen gegen Schilddrüsenantigene gerichtet sind oder Diabetes

mellitus Typ 1 (T1D), bei dem autoreaktive T-Zellen gegen Antigene der Inselzellen im Pankreas gerichtet sind, entstehen (Abbildung 1.6).

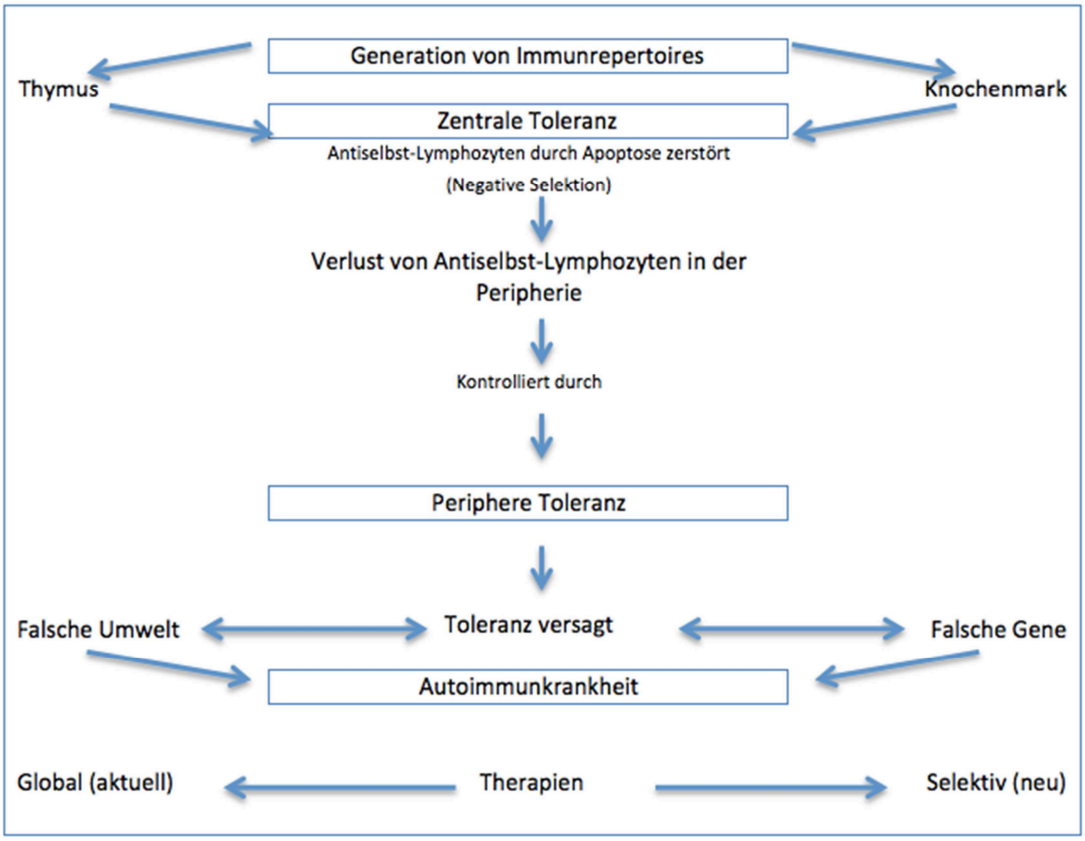


Abbildung 1.6: Aufbau und Fehlfunktion von Toleranz. Zunächst wird ein Repertoire an Immunzellen in den zentralen lymphoiden Organen Thymus und Knochenmark generiert und begleitet durch die Entfernung von selbst-reaktiven Lymphozyten mittels Apoptose. Die Durchlässigkeit dieser Prozedur benötigt eine weitere Hürde, die periphere Toleranz. Autoimmunität entwickelt sich aus dem Versagen der Toleranz durch den Einfluss von fehlerhaften Genen oder verändernden Umweltbedingungen. Der Ersatz von globalen Immunsuppressionstherapien durch selektive schafft neue Behandlungsoptionen. Modifiziert nach: Mackay, BMJ 321:93-96 (2000)

1.7 Autoimmunität

Durch die Bildung eines Reservoirs an selbstspezifischen Lymphozyten, welche aus ignoranten T-Zellen und Zellen bestehen, die die zentrale und periphere Toleranzinduktion umgangen haben, kann es zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen kommen (Abbildung 1.6). Die Pathogenese bei den meisten autoimmunen Prozessen ist bisher unklar, dennoch lassen sich die Faktoren für die Entstehung grob in genetische und epigenetische unterteilen.

1.7.1 Genetische Faktoren

Alle Autoimmunkrankheiten haben wahrscheinlich eine genetische Komponente (Vyse, Morley et al. 1996). Zum Beispiel zeigen Studien das Paare von Verwandten in Familien mit Autoimmunerkrankungen den gleichen auffälligen Genlocus teilen. Ausgewählte Mäuse von autoimmunen Stämmen (wie NOD („*Non-Obese Diabetic*“)-Mäuse oder NZB („*New Zealand Black*“)-Lupus-Mäuse) haben identische anfällige Genloci für Autoimmunität homolog zu denen, die auch in humanen Erkrankungen identifiziert wurden (Griffiths, Encinas et al. 1999).

1.7.2 Epigenetische Faktoren

Die Prävalenz an einer Autoimmunschwäche zu erkranken liegt bei Frauen dreimal so hoch als bei Männern. Bei systemischem Lupus erythematosus ist das Verhältnis sogar bei 9 Frauen pro Mann. Die unterschiedliche Produktion an Sexualhormonen hat einen erheblichen Einfluss auf die Entwicklung einer Autoimmunerkrankung und spricht deutlich für die weibliche Prädisposition (Mackay 2000).

1.7.3 Autoimmunität und Infektionen

Durch Vorliegen bestimmter epigenetischer und genetischer Prävalenzen können Infektionen Autoimmunerkrankungen auslösen, wobei der grundlegende Mechanismus noch nicht geklärt ist. Verschiedene Möglichkeiten werden diskutiert. Der erste Mechanismus befasst sich mit der Expression von Superantigenen durch das Pathogen. Die Superantigene aktivieren dabei eine Subpopulation von T-Zellen, unabhängig von ihrer Spezifität, und autoreaktive T-Zellen, die anschließend eigenes Gewebe angreifen (Conrad, Weidmann et al. 1994). Bakterielle, als auch virale Superantigene nutzen diesen Mechanismus (Scherer, Ignatowicz et al. 1993).
Ein weiterer Mechanismus wird von *Oldstone et al.* beschrieben, welcher auf der direkten Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen durch bakterielle oder virale Epitopen beruht (Oldstone 1998). Der Grund für die Aktivierung liegt in der strukturellen Ähnlichkeit von Selbst- und Fremd-Epitop, die als molekulares Mimikry beschrieben wird.

Der dritte Mechanismus beruht auf einer „*bystander“* Aktivierung, dort kann ein viraler Infekt selbstreaktive T-Zellen bei einer Immunantwort gegen ein Pathogen stimulieren (Whitton and Fujinami 1999). Eine Erklärung dafür gibt *Horwitz et al.*, bei einem Gewebeschaden, der entweder zytologischer, viraler oder antimikrobieller Herkunft ist, werden große Mengen an körpereigenen Gewebefragmenten die als Selbst-Antigen fungieren, freigesetzt, durch APC aufgenommen und autoreaktiven T-Zellen präsentiert (Horwitz, Bradley et al. 1998). Die Reaktion würde sich zunächst auf pathogene Antigene richten, kann aber auch auf die erhöhte Anzahl an Selbst-Antigenen übergreifen, was als „*Epitop-Spreading*“ bezeichnet wird (Lehmann, Forsthuber et al. 1992).

1.7.4 Autoimmunerkrankungen

Durch die oben dargelegten Mechanismen können diverse Autoimmunerkrankungen entstehen. Diese variieren von organ-spezifisch zu systemischen Erkrankungen und umfassen unter anderem Multiple Sklerose (MS), Rheumatoide Arthritis, Systemischen Lupus Erythematosus, Hashimoto-Thyreoditis, Glomerulonephritis (Nephrotoxische Nephritis) und Diabetes Mellitus Typ I (Muhammad 2014).
Autoimmunerkrankungen sind meist schwierig zu diagnostizieren, weil der Ausbruch schleichend sein kann und iniitale Symptome oft unspezifisch sind. Dazu gehören Müdigkeit, Abgeschlagenheit oder Fieber (Mackay 2000). Zum Beispiel kann die Hashimoto-Thyreoiditis eine Schilddrüsenunterfunktion auslösen, welche durch Hormonverlust Symptome wie Müdigkeit und Abgeschlagenheit aufweist. Im Patienten als auch im Tiermodell ist häufig zu beobachten, dass das infizierte Organ auch das Ziel der Autoimmunreaktion ist und die Unterscheidung zwischen einem autoimmunen Gewebeschaden und einer Immunreaktion gegen ein persistierendes Pathogen schwierig ist und vorwiegend von der Empfindlichkeit der Nachweismethoden für die Existenz einer mikrobiellen Infektion abhängt (Rose and Mackay 2000). Zum Beispiel führt die Immunantwort gegen das Rabies-Virus und nicht eine Autoimmunreaktion zur Nervenzellschädigung.

1.7.5 T-Zellvermittelte Autoimmunität anhand des Beispiels Glomerulonephritis

Die Glomerulonephritis umfasst einen Bereich an teils autoimmun-vermittelten Störungen, welche eine Entzündung innerhalb der Glomeruli in der Niere verursachen (Muhammad 2014). Das nephrotoxische Nephritis-Mausmodell zeigt eine ähnliche Aussagekraft wie Studien mit humaner Glomerulonephritis. Durch Injektion von nephrotoxischem Schafserum (NTS) kann eine nephrotoxische Nephritis (NTN) ausgelöst werden. Die Krankheit löst einen Nierenschaden aus, welcher durch Proteinurie, Haematurie und eine verminderte glomeruläre Filtrationsrate (GFR) messbar ist. Schäden an den Podozyten oder an der glomerulären Basalmembran (GBM) können Selbst-Antigene freisetzen. Eine Migration von inflammatorischen Leukozyten in die glomerulären und interstitiellen Kompartimente der Niere setzt ein. Die dominanten Zelltypen wie Makrophagen und T-Zellen werden durch die Interaktion mit renalen Zellen und DC aktiviert (Heymann, Meyer-Schwesinger et al. 2009, Muhammad 2014). Zusätzlich kann eine Typ III Hypersensivitätsreaktion durch die Ausbildung von Immunkomplexen zwischen Antigenen, Selbst-Antigenen und Antikörpern ausgelöst werden, welche einen Progress der NTN darstellt.
Die nephrotoxische Nephritis stellt ein Tiermodell dar, welches die humane Glomerulonephritis nachahmen soll.

1.7.6 T-Zellvermittelte Autoimmunität anhand des Beispiels T1D

Typ I Diabetes oder Insulin-abhängiger Diabetes, entsteht durch Zerstörung von Insulin-produzierenden β-Inselzellen des Pankreas durch selbstreaktive Zellen. Eine chronische Infiltration der pankreatischen Inselzellen durch mononukleare Zellen stellt das pathologische Charakteristikum der Krankheit dar (Atkinson and Maclaren 1990, Atkinson, Bowman et al. 1994). Der Krankheitsherd setzt sich vornehmlich aus T-Zellen zusammen, welche eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Störung einnehmen (Atkinson, Bowman et al. 1994, Atkinson 2012). Während des Einsetzens von T1D infiltrieren Zellen des innaten und adapativen Immunsystems die Inselregionen des Pankreas, um eine Insulitis zu erzeugen. Wichtige Erkenntnisse der pathologischen Prozessen wurden mit Hilfe des NOD- und RIP („*Rat Insulin Promoter“)*-mOVA (mOvalbumin)-Mausmodell gewonnen (Kurts, Carbone et al. 1997, Graham, Sanders et al. 2008, Graham, Sutherland et al. 2012). Unter anderem

zeigen humane und murine Modelle in Studien, dass autoimmune destruktive Prozesse in T1D auftreten, eingeleitet durch zell-vermittelte organ-spezifische Methoden und dass diese sowohl $CD4^+$- und $CD8^+$-T-Zellen, als auch Makrophagen benötigen (Morran, Omenn et al. 2008, Hamel, Mauvais et al. 2016, Wang, Xie et al. 2017). Generell dienen die Makrophagen als APC, welche β-Zellantigene direkt aufnehmen und präsentieren. Dadurch werden β-zellspezifische zytotoxische $CD8^+$-T-Zellen aktiviert und autoreaktive $CD4^+$-T-Effektorzellen generiert. CTL können die β-Zellen direkt eliminieren, während die $CD4^+$ T-Zellen die Aktivierung von B-Zellen einleiten, welche eine Autoantikörperproduktion mit sich zieht. CTL besitzen einerseits die Möglichkeit der direkten β-Zellzerstörung durch zytotoxische Effekte, können andererseits aber auch die β-Zellzerstörung durch Freisetzung von zytotoxischen Molekülen, wie Zytokine, Granzym B und Perforin beeinflussen. Der β-Zelltod kann auch durch die Fas-FasL-Signalkaskade der CTL induziert werden. Alle Immunzellen akkumulieren zunächst in den Inselherden, ohne destruktiv zu sein. Ein unbekannter Auslöser begünstigt die autoimmune Zerstörung von β-Zellen. Klinische Manifestationen von Diabetes treten nach 90 % Zerstörung der β-Zellmasse auf (Morran, Omenn et al. 2008).

1.7.7 Behandlungsmethoden

Therapieansätze zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen variieren in ihrer Form und Einsatzspanne. Das Ersetzen von unspezifischer Immunsuppression durch eine selektive Immuntherapie für Autoimmunkrankheiten sollte das Ziel der aktuellen Forschung darstellen (Mackay 2000).
Daher sollten Therapien entwickelt werden, welche eine genaue Kontrolle der Funktionsweise molekularer und zellulärer Elemente des Immunsystems beinhalten.
Im Zusammenhang von Autoimmunerkrankungen ist die Immuntherapie definiert als Strategie, die entweder die Dysregulation des Immunsystems unterbricht oder eine spezifische Immuntoleranz gegen Selbst-Antigene induziert (Walter, Farmer et al. 2016). Immunologen haben immuntherapeutische Verfahren entwickelt wie adoptiven regulatorischen Zelltransfer (z.B. regulatorische T-Zelltherapie), Effektorzellzerstörung (z.B. anti-Thymozytenglobulin (ATG)) oder unselektive molekulare Immunmodulation (z.B. IL-1-Agonisten). Ein Therapeutikum, welches selektiv in einen autoimmunen Prozess eingreift, stoppt und möglicherweise sogar

umkehrt, wäre ein Durchbruch der modernen Medizin in der Bekämpfung spezieller Autoimmunerkrankungen.

1.7.8 Allgemeine und spezifische Behandlungsansätze anhand des Beispiels T1D

Der aktuelle „Goldstandard“ für ein murines Diabetes-Model, die NOD-Maus, bei welcher eine Genanalyse, die Definition von Toleranz, das Verstehen der zellulären Basis von Immunantworten und der Einblick in die β-Zellbiologie schon beschrieben wurden, hat einen großen Beitrag zur Konversion von murinen zu humanen Tests geleistet (Delovitch and Singh 1997, Shoda, Young et al. 2005, Garyu, Meffre et al. 2016, Gill, Pagni et al. 2016). Dabei ist das generelle Ziel der Behandlung die Suppression aktvierter autoreaktiver Immunzellen. Erste Behandlungsansätze wurden mit Substanzen, die generell immunsupprimierende Eigenschaften besitzen, durchgeführt. Das Medikament Cylcosporin A wirkt mechanistisch über die Deaktivierung von Calcineurin in T-Zellen, welches sonst über die Dephosphorylierung des Gen-regulierenden Proteins NF-AT („*nuclear factor of actitvated T-cells*“) das Ablesen von diversen Zytokinen wie z.B. IL-2 und IFN-γ ermöglicht. Diese Zytokine helfen bei der weiteren Proliferation und Differenzierung von Immunzellen. Leider sind die Ergebnisse der klinischen Tests mit Cylcosporin A enttäuschend gewesen, welches nur eine temporäre, jedoch keine permanente Verbesserung des β-Zellverlusts hervorrufen konnte (Assan, Feutren et al. 1985, Bach 1987, Silverstein, Maclaren et al. 1988, Garyu, Meffre et al. 2016). Daher ist das primäre Ziel der Intervention den Ausbruch von T1D zu stoppen oder wenigstens den Verlauf der β-Zellzerstörung zu verlangsamen und die verlorenen Zellen zu ersetzen (Garyu, Meffre et al. 2016).

Ein selektiver Behandlungsansatz könnte die Nutzung von Antikörper, welche Oberflächenmoleküle auf bestimmten Immunzellen blockieren, darstellen. Im Falle einer Behandlung mit CTLA-4 („*Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein*“)-Ig, anti-CD20 oder CD3-Antikörper Otelixizumab konnte eine signifikante Verzögerung des Verlusts der β-Zellfunktion in den ersten beiden Jahren nachgewiesen werden, jedoch mit einem stetigen Rückgang der Wirkung (Keymeulen, Walter et al. 2010, Orban, Bundy et al. 2014, Pescovitz, Greenbaum et al. 2014).

Ein alternativer Behandlungsansatz ist, bezogen auf die Langzeittherapie, die Anwendung von Allotransplantationen von pankreatischen Gewebe in T1D-Patienten,

welche vorherige Methoden deutlich übertrifft. Dort wurde nach 3 Jahren eine ausreichende Insulinproduktion in mehr als 80 % der Transplantate mit Rapamycin-basierter Erhaltungstherapie festgestellt (Gruessner and Gruessner 2013). Inselzelltransplantationen, die nicht immer das Empfängerinsulin unabhängig ausschütten, sind fähig die Rate an schweren Hypoglykämien zu reduzieren (Ryan, Paty et al. 2005).

Zukünftig könnte die Entwicklung von Ersatz-β-Zellen, gereift aus Stammzellen, eine Schlüsselrolle für eine Therapie einnehmen, welche potentiell eine nahezu grenzenlose Quelle für die Wiederherstellung eines physiologischen metabolischen Zustands wäre (Krishnan, Alexander et al. 2014).

Diese Art von Behandlungsansatz befindet sich jedoch noch am Anfang, womit die Suche nach Molekülen, die selektiv und langfristig in die Signalkaskade des dysregulierten Immunsystems eingreifen können, um Autoimmunität zu verhindern, weitergeht. Die Frage nach einer möglichen immunmodulierenden Substanz soll im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden.

2. Zielsetzung der Doktorarbeit

Aus Beobachtungen von *Majewski et al.* ergaben sich Hinweise, dass die natürliche Substanz Rottlerin, gewonnen aus dem Kamalabaum, immunmodulatorische Eigenschaften besitzt. Insbesondere vermutete ich einen Effekt auf die Kreuzpräsentation *in vitro*. Da sich mein initiales Experiment mit Anwendung von Rottlerin auf die Kreuzpräsentation mit den Ergebnissen von *Majewski et al.* über den Effekt von Rottlerin auf die klassische Antigenpräsentation deckte, sollten die immunmodulatorischen Effekte von Rottlerin auf die Antigenkreuzpräsentation und deren Mechanismus im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Sollten sich die Ergebnisse der Vorexperimente bestätigen, so sollte weiterhin überprüft werden, ob Rottlerin auch die Immunantwort in *in vivo*-Modellen manipulieren könnte. Zunächst wurden dazu im Rahmen dieser Doktorarbeit verschiedene *in vivo*-Krankheitsmodelle ohne den Einsatz von Rottlerin auf Funktionalität und Durchführbarkeit untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Geräte

Gerät	Firma
Avanti J-20 XP Zentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Bechergläser, Messzylinder, Kolben	VWR, Darmstadt
Biofuge fresco	Thermo Scientific, Schwerte
Durchflußzytometer (FACS)	Becton Dickinson, Heidelberg
Durchlichtmikroskop	Leica, Wetzlar
Elektroporator GenePulser Xcell	BioRad, München
Entsorgungsbeutel	Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorfgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
FACS Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
FACS Röhrchen (steril)	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon Röhrchen (15ml und 50ml)	Greiner Bio–One, Frickenhausen
Feinwaage	Ohaus, Nänikon, Schweiz
Fluoreszensmikroskop	IX71 Olympus, Düsseldorf
Flüssigstickstofftank	MVE, Jüchen
Gefrierschrank (-20°C)	Thermo Scientific, Schwerte
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Scientific, Schwerte
Gelanalysersystem GelDoc	BioRad, München
Glasflaschen (200ml, 500ml und 1000ml)	Simax, Boca Raton, USA
Glaspipetten (5ml, 10ml und 20ml)	Hirschmann, Eberstadt
Heizblock	Unitek, Leutenbach
Inkubator (HERA cell 240)	Thermo Scientific, Schwerte
Inkubatoren	Thermo Scientific, Schwerte
Kanülen (23G, 26G und 27G)	Braun, Kronberg
Mikrotom	
Kühlschrank (4°C)	Liebherr, Meinerzhagen
MACS Multistand (Magnet, Quadro MACS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS Separation Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Mauskäfige	Allentown, Aschaffenburg
Mauskäfige	Techniplast, Hohenpeissenberg
Multifuge 3 S-R	Thermo Scientific, Schwerte
Nanodrop Photometer	Thermo Scientific, Schwerte
Nitril Handschuhe (Micro touch)	Ansell, München
Nylon Filter (blau)	Becton Dickinson, Heidelberg
Objektträger und Deckgläser	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Parafilm	Bemis, Neenah, USA
PCR Cycler	PeqLab, Erlangen
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
pH Meter	Heidolph, Schwabach
Pipetten	Eppendorf, Hamburg

Pipettenspitzen	Greiner Bio–One, Frickenhausen
Rotlichtlampe (für Injektion)	Philips, Hamburg
Scanner	Canon, Krefeld
Schüttler	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Skalpell	Feather Saftey Razor, Osaka, Japan
Spritzen (1ml)	Braun, Kronberg
Spritzen (2ml und 5ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilbank	Thermo Scientific, Schwerte
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Thermoschrank	Aqua Lytic, Dortmund
Tischwaage	Sartorius, Göttingen
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Vortexer	VWR, Darmstadt
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zellkulturplatte (6-, 24- und 96- Well Platten)	TPP, Trasadingen, Schweiz

3.1.2 Software

Adobe Acrobat	Adobe, San Jose, USA
Adobe Illustrator	Adobe, San Jose, USA
BD FACSDiva	BD Bioscience, Heidelberg
EndNote	Tomson Reuters, New York, USA
FlowJo	Tree Star, Ashland, USA
Image J	NIH, Bethesda, USA
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, USA
Prism	Graph Pad, San Diego, USA

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Reagenzien	**Firma/Hersteller**
10% Tween	Roth, Karlsruhe
100 Basenpaar-Marker	Fermentas
1000 Basenpaar-Marker	NEB, Ipswich, USA
10x Zelllysepuffer	Cell Signaling
1668 CpG Oligonukleotide	InvivoGen, San Diego, USA
Aceton	Roth, Karlsruhe
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicilin	Sigma, Hamburg
Anti-Biotin Microbeads	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Bacto-Trypton	Sigma-Aldrich, Hamburg
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAA, Cölbe
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Calibrate beads (APC)	Becton Dickinson, Heidelberg

$CD8^+$-T-Zellisolationskit	Miltenyi, Bergisch Gladbach
CFSE	eBioscience
Destiliertes Wasser	Braun
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Hamburg
DMA	Sigma, Hamburg
DMEM GlutaMax	Gibco, Darmstadt
DMSO	Sigma-Aldrich, Hamburg
DNAse I	Sigma-Aldrich, Hamburg
dNTPS	Promega, Fitchburg, USA
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Endotoxinfreies Ovalbumin	Hyglos, Bernried
Epoxomycin	Sigma, Hamburg
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
FCS	PAA, Cölbe
Flow Cytomix Zytokin-Kits	eBioscience, Frankfurt
Gentamicin	Gibco, Darmstadt
Glycerin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Glycin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Hepes	Sigma-Aldrich, Hamburg
Höchst 33342	Invitrogen, Darmstadt
IMDM	Gibco, Darmstadt
Immumount	Genetex, Irvine, USA
Isofloran (100%)	Abbott, Wiesbaden
Kalium-Acetat	Sigma-Aldrich, Hamburg
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Hamburg
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Hamburg
Kanamycin	Sigma, Hamburg
Kollagenase A	Roche Diagnostic, Mannheim
L-Glutamin (200 mM) ($C_5H_{10}N_2O_3$, MW=146.1)	Invitrogen, Karlsruhe
LPS	InvivoGen, San Diego, USA
Mitomycin C	Sigma-Aldrich, Hamburg
n – Ethylmaleimide (NEM)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Natrium Azid (NaN_3)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Natrium-Pyruvat	PAA, Cölbe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Nicht essentielle Aminosäuren	Gibco, Darmstadt
NucleoSpin DNA-Aufreinigungskit	Macherey-Nagel, Düren
Ovalbumin (Grade 5)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Ovalbumin Peptid 257-264 (SIINFEKL)	InvivoGen, San Diego, USA
Ovalbumin-AlexaFluor647	Invitrogen, Darmstadt
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Hamburg
PBS – Tabletten	Gibco, Darmstadt
Penicillin/Streptomyzin	PAA, Cölbe
PMSF (>99%)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Hamburg
Proteaseinhibitor	Roche, Penzberg
Proteinase K	Sigma-Aldrich, Hamburg
Rottlerin	Calbiochem

SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe
ß - Mercaptoethanol	Gibco, Darmstadt
Superscript III Reverse Transkriptase	Invitrogen, Darmstadt
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tissue - Tek	Sakura, Leiden, Niederlande
TrisBase	Sigma-Aldrich, Hamburg
TrisHCl	Sigma-Aldrich, Hamburg
TritonX	100 Roth, Karlsruhe
Trypan Blau, 0.4 %	Biochrom, Berlin
Trizol	Invitrogen, Darmstadt
Xylol	Roth, Karlsruhe

3.1.4 Antikörper

Antigen	**Isotyp**	**Klon**	**Notizen**	**Quelle**
CD3e	IGG, Hamster	145-2C11		BioLegend
CD8α	IgG2α, Maus	53-6.7		eBioscience
CD11b	IgG2b, Maus	M1/70		BD
CD11c	IgG1, Hamster	HL3	Integrin αX-Kette	eBioscience
CD25	IgG2b κ, Ratte	3C7	IL-2-Rezeptor alpha-Kette	BD
CD28	IgG1, κ, Maus	CD28.2		BioLegend
CD40	IgG2α, Maus	1C10		BioLegend
CD69	IgG1, Hamster	H1.2F3		BD
CD80	IgG, Maus	16-10A1		eBioscience
CD86	IgG2α, Maus	GL1		eBioscience
EEA1	IgG, Kaninchen	H300		Santa Cruz
F4/80	IgG2b, κ, Maus	CI:A3-1		BioLegend
LAMP1	IgG1, Maus	1D4B		BD
MHC I	IgG2α, Maus	AF6-88.5.5.3		eBioscience
Rat-Alexa647	IgG1, κ, Maus	150D		BioLegend
TCRβ	IgG1, κ, Maus	IP26		BioLegend

Tabelle 3.1: Liste mit verwendeten Antikörpern

Die genutzten Antikörper waren entweder mit Biotin oder einem von verschiedenen Fluorochromen (PB, FITC, PE, PerCP-Cy5.5 oder APC) konjugiert.

Streptavidin konjugierte sekundäre Antikörper:
AlexaFluor647 (Invitrogen, Karlsruhe)

Lösung zum Ausschluss von toten Zellen:
Hoechst 33342 (Sigma, Taufkirchen)

Magnetische Beads:
CD11c (Miltenyi, 130-052-001)
Anti-Biotin (Miltenyi, 130-091-147)

3.1.5 Mauslinien

1. C57/B6: MHC Haplotype H-2K^b Mäuse wurden von Charles River erworben.

2. OT-I T-Zellrezeptor transgene Mäuse: Vα2Vβ5 TCR erkennt SIINFEKL im Kontext von H-2K^b. Dr. W.R. Heath, Melbourne, Australia, bereitgestellte OT-I Mäuse auf Rag-1$^{1-1}$-Hintergrund.

3. OT-I T-Zellrezeptor transgene Mäuse auf C57/B6-Hintergrund wurden von Dr. Andreas Limmer (IMMEI, Bonn) zur Verfügung gestellt.
4. RIP-mOVA transgene Mäuse auf C57/B6-Hintergrund wurden von Dr. Andreas Limmer (IMMEI, Bonn) zur Verfügung gestellt.

3.1.6 Puffer

Blockpuffer

Blockpuffer besteht aus 1 % BSA in PBS. Die Lösung wurde bei 4° C aufbewahrt.

Zellkulturmedium

IMDM mit L-Glutamin, 10 % FCS, 100 IU/ml Penicilin, 100 µg/ml Streptomycin, 50 µM β-Mercaptoethanol. Das Medium wurde bei 4° C aufbewahrt.

CFSE-Stock

5, 6-Carboxy-Fluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) wurde als Stocklösung vorbereitet (100 µg/ml in DMSO) und bei -20° C eingefroren. Die Arbeitslösung wurde in PBS gelöst, um eine Konzentration von 20 mM zu erlangen.

Kollagenase A-Stock

Kollagenase A wurde in PBS mit einer Konzentration von 100 mg/ml gelöst. Die Aliquots wurden bei -20° C gelagert. Die Arbeitslösung wurde bei einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst.

DNAse I-Stock

Die DNAse I wurde mit einer Konzentration von 10 mg/ml in PBS gelöst. Die Aliquots wurden bei -20° C gelagert. Die Arbeitslösung wurde bei einer Konzentration von 0.1 mg/ml gelöst.

EDTA 0.5 M

186.1 g Ethylendiamintetraacetat (EDTA) wurde in 800 ml Aqua dest. gelöst. Der pH wurde mit NaOH auf 8.0 eingestellt und mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

FACS-Puffer

Der FACS-Puffer bestand aus PBS, mit 0.1 % BSA und 0.01 % NaN_3. Die Lösung wurde bei 4° C gelagert.

F_c-Block

Aufgereinigtes Ratte-Anti-Maus-CD16/CD32 (Maus, BD, F_c-Block, 553141) hatte eine Konzentration von 0.5 mg/ml und wurde bei 4° C aufbewahrt. Die Arbeitslösung wurde mit PBS auf eine Konzentration von 2.5 µg/ml eingestellt.

MACS-Puffer

MACS-Puffer beinhaltete 0.5 % BSA und 2 mM EDTA, gelöst in PBS. Die Lösung wurde bei 4° C aufbewahrt.

PBS

20 mM NaH_3PO_4 und 50 mM NaCl wurden in Aqua dest. gelöst und der pH auf 7.4 eingestellt. Die Lösung wurde autoklaviert und bei 4° C gelagert.

PBS mit 0.1 % Bovinem Serum Albumin (BSA)

PBS mit 0.1 % BSA wurde hergestellt, indem 0.1 g BSA (> 98 % Reinheit, Serva, Heidelberg) in 100 ml PBS gelöst wurde. Die Lösung wurde mittels Filtration durch einen sterilen 0.45 µm Filter sterilisiert

20 % Paraformaldehyd (PFA)

40 g PFA wurden in 200 ml PBS gelöst und bei 60° C in einem Wasserbad inkubiert bis PFA vollständig gelöst war. Der pH wurde auf 7.4 eingestellt, der Puffer aliquotiert bei -20° C eingefroren. Die Arbeitslösung wurde auf 4 % verdünnt, indem 12 ml PBS zu 3 ml 20 % PFA hinzugefügt worden.

Rote Blutzellen-Entfernungspuffer (RCB)

RCB wurde hergestellt, indem 15.58 g NH_4Cl (146 mM), 0.074 g Ethylendiamin-tetra-Essigsäure (EDTA)-Dinatriumsalz (2 mM) und 2.0 g $NaHCO_3$ (10 mM) in 2 L Aqua dest. gelöst worden. Der endgültige pH betrug 7.3. RCB wurde bei 4° C genutzt.

Permeabilisationspuffer (PERM)

PERM-Puffer enthielt 3 % BSA und 0.1 % Triton X-100. Die Lösung wurde bei 4°C aufbewahrt.

3.2 Methoden

Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus murinen Milzen

Murine Milzen wurden in kaltem, sterilen PBS aufgenommen und mit jeweils 2 ml DNAse/Kollagenase-Lösung injiziert. Danach wurden die Milzen mit einem sterilen Skalpell in kleine Stücke geschnitten und für 20 Minuten bei 37° C verdaut. Es folgte eine weitere Zerkleinerung mittels Metallsieb auf Eis. Die gewonnene Zellsuspension wurde über einen 40 µm-Filter von größeren Trümmern befreit. Die gefilterte Einzelzellsuspension konnte nun für weitere Experimente verwendet werden.

Durchflusszytometrie

Nach der Isolation von Zellen aus dem Gewebe durch ein vorgeschriebenes Protokoll (siehe Herstellung von Einzelzellsuspensionen), wurden diese mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und der erhaltene Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 200 µl FACS-Puffer mit F_c-block (1:200) gelöst und für 20 Minuten bei 4° C inkubiert. Darauffolgend wurden die Zellen mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und mittels Zentrifugation gesammelt. Der Überstand wurde ein weiteres Mal verworfen und die Zellen mit 200 µl FACS-Puffer, welcher verschiedene Fluoreszenz-konjugierte Antikörper mit einer beschriebenen Konzentration enthielt, gefärbt für 25 Minuten bei 4° C. Nach einem zusätzlichen Waschvorgang wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen und bei 4° C gelagert. Die Analyse mittels Durchflusszytometrie wurde an einem FACS-CANTO II (BD) durchgeführt. Dupletten wurden durch Nutzung eines FSC-w/SSC-Fenster ausgeschlossen. Tote Zellen wurden durch die Färbung mit Hoechst 33342 ausgegrenzt. Die Daten wurden mit der FlowJo Software (Tristar, Ashland, OR) ausgewertet.

Entfernung von roten Blutzellen

Einzelzellsuspensionen wurden von roten Blutzellen befreit, indem die Zellen in 1 ml RCB für 1 Minute resuspendiert, mit 10 ml FACS-Puffer gestoppt und anschließend zentrifugiert worden.

Generierung von Knochenmarks-abgeleiteten DC (BM-DC)

BM-DC wurden mittels GM-CSF (engl. "*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*") differenziert. Dazu wurde Knochenmark aus Femur und Tibia der C57/B6-Mäuse mit PBS herausgespült und als PBS-Suspension in 50 ml Falcon Röhrchen überführt. Die Suspension wurde über einen 40 µm Sterilfilter aufgereinigt. Die Knochenmarkszellen wurden dann durch eine 5-minütige Zentrifugation am Falcon Röhrchenboden gesammelt und pro Zellpräparation in 45 ml IMDM ("*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*") mit 10 % FCS („*Fetal calf serum*“), 1 % Penicilin/Streptomycin, sowie 5 mM 2-Mercaptoethanol resuspendiert. Dem Medium wurde zusätzlich 15 % aufgereinigte GM-CSF-Lösung hinzugefügt. Die Zellen wurden auf 3x10 cm Petrischalen ausplattiert und bei 37° C und 5 % CO_2 im Brutschrank kultiviert. An Tag 3 oder 4 wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:2 aufgetrennt. Letztlich wurden an Tag 7 die Zellen mit 2 mM EDTA geerntet und für die entsprechenden Experimente genutzt.

Lebendzellzählung

10 µl einer Einzelzellsuspension wurden entnommen und mit 190 µl Trypan Blau-Lösung vermischt. Lebende Zellen (ohne Trypan Blau-Färbung) wurden unter dem Lichtmikroskop mit Hilfe einer *Neubauer*-Kammer gezählt. Die totale Zellzahl wurde mit folgender Formel berechnet: Anzahl der Zellen in den 4 Quadranten * (1/4) * 20 * 10000.

Zentrifugation

Milz-, Darm-, oder Nierenzellsuspensionen wurden in 15 ml oder 50 ml Falcon Röhrchen für 10 Minuten bei 450 x g bei 4° C zentrifugiert. 5 ml FACS-Röhrchen für die Durchflusszytometrie wurden für 5 Minuten bei 200 x g bei 4° C zentrifugiert.

Herstellung von löslichem OVA

200-250 mg OVA wurden mittels Schüttler in 3 ml PBS gelöst. Die Lösung wurde bei 5000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurde eine PD10 Säule für

die Equilibrierung mit 4 x 5 ml PBS vorbereitet. Der OVA-Überstand wurde nach der Zentrifugation der Säule in einem Volumen von 2.5 ml hinzugefügt und danach in 3.5 ml PBS eluiert. Die Lösung wurde mit Hilfe eines sterilen Filters sterilisiert. Die OVA-Konzentration wurde mit einem Nanodrop (Spectrophotometer ND-1000, Peqlab, Erlangen) gemessen.

Isolation von OT-I-Zellen von OT-I-Rag$^{-/-}$-Mäusen

Nach Präparation der murinen Milz und den intestinalen Lymphknoten wurden diesen Kollagenase A und DNAse I (Sigma Aldrich, Steinheim) injiziert und in kleine Stücke geschnitten. Nach 20 Minuten Inkubationszeit wurden die kleinen Stücke durch ein Metallsieb gepresst, bevor sie durch einen 40 µm Sterilfilter in 50 ml Falcon Röhrchen überführt worden. Eine Zentrifugation von 15 Minuten bei 4° C schloss sich an. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 µl MACS-Puffer gelöst. 30 µl CD8$^+$-T-Zellisolationskit 1 wurden hinzugefügt und eine Inkubation von 10 Minuten bei 4° C erfolgte. 30 µl des CD8$^+$-T-Zellisolationskit 2 wurden mit der Lösung vermischt und weitere 15 Minuten bei 4° C Inkubation wurden durchgeführt. Danach wurde die Lösung mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen und für 5 Minuten zentrifugiert. Die in 3 ml MACS-Puffer resuspendierte Lösung wurde auf eine equilibrierten MACS-Säule aufgetragen. Die zuerst durchgelaufene negative Fraktion wurde weiterverwendet, für 5 Minuten zentrifugiert, in 1 ml PBS resuspendiert und enthielt die isolierten OT-I-Zellen.

Immunzytochemie

BM-DC wurden auf sterile Glas-Coverslips in 24-Lochplatten ausgesäht. Zur Untersuchung der OVA-Aufnahme in den Zellen wurden diese 45 Minuten lang mit 5 µg/ml löslichem Floureszenz-markiertem OVA inkubiert. Die Zellen wurden vor und nach einer 10-minütigen Fixierung mit 4 % PFA mit PBS gewaschen. Zur Membranpermeabilisation wurden die Zellen mit 5 % Milchpulver behandelt und 2.5 µg/ml Fc-Block in PERM-Puffer für eine Stunde geblockt. Es schlossen sich 2 weitere Waschschritte mit 1 % BSA in PBS an und die Zellen wurden in einer feuchten Kammer über Nacht mit den entsprechenden Primärantikörpern in 1 % BSA in PBS inkubiert. Nach 10 Stunden wurden die Zellen wieder mit 1 % BSA in PBS

gewaschen und eine Stunde bei RT mit den Sekundärantikörpern in 1 % BSA in PBS inkubiert. Die Zellkerne wurden mit 1 µg/ml Hoechst 33342 für 5 Minuten angefärbt und wiederum 2 weitere Male gewaschen. Nachdem wurden die Coverslips kurz getrocknet, mit Immumount bedeckt, auf einem Objektträger fixiert und dunkel gelagert. Die Analyse der Zellen erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops (IX71, Olympus, Düsseldorf).

In vitro Kreuz-Präsentationsassay

BM-DC wurden wie oben beschrieben generiert und mit 500 µg/ml OVA für 2 Stunden bei 37° C inkubiert. OT-I-Zellen wurden von OT-IRag$^{-/-}$-Mäusen entnommen und über ein CD8^{+}-T-Zellisolationskit aufgereinigt, 1 x 10^5 BM-DC wurden mit 1 x 10^5 OT-I-Zellen in einer 96-Lochplatte kokultiviert. Als Negativkontrolle wurden BM-DC und OT-I-Zellen ohne OVA kultiviert. Nach 18 Stunden wurde der entsprechende Überstand der 96-Lochplatte in 5 ml FACS-Röhrchen gesammelt. Dazu wurde 2 mM EDTA-Lösung genutzt, um die Zellen von der Lochoberfläche abzulösen und zu ernten. Danach schloss sich eine Färbung für die T-Zellaktivierungsmarker CD25 und CD69 an.

In vitro OVA-Aufnahme

BM-DC wurden wie oben beschrieben generiert und nach der Differenzierung auf einer 24-*well*-Platte kultiviert. 250 ng/ml Alexa647-gekoppeltes OVA wurde hinzugefügt und die Zellen wurden für 2 Stunden bei 37° C inkubiert. Nachdem die Zellen mit 2 mM EDTA gelöst und geerntet worden, wurden die Zellen für die Oberflächenproteine CD8α, CD11c und F4/80 gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

In vivo OVA-Aufnahme

5 µg/g Körpergewicht lösliches Alexa647-gekoppeltes OVA wurde in die Schwanzvene von Mäusen injiziert. 45 Minuten später wurden die Milzen isoliert und mit 1-2 ml Kollagenase A/DNAse I-Mix für 20 Minuten verdaut. Die isolierten Zellen

wurden für die Oberflächenmarker CD8α, CD11c und F4/80 wie beschrieben gefärbt. Danach wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert.

In vivo Kill Assay

Es wurden C57BL/6 Mäusen 200 µg/Maus OVA und 20 µg/Maus CpG (Cytosin-Guanin Oligonukleotid) injiziert. Nach 5 Tagen wurden die Zielzellen zur Analyse der *in* vivo Zytotoxizität vorbereitet. Aus den Milzen und Lymphknoten von anderen Mäusen wurden die Zielzellen in einer Einzelzellsuspension präpariert und in zwei Fraktionen in jeweils 10 ml PBS aufgeteilt. Eine Fraktion wurde mit 20 mM SIINFEKL für 10 Minuten bei 37° C inkubiert, während die andere für die gleiche Zeit in reinem PBS gehalten wurde. Danach wurden je 10 ml PBS, welches eine hohe und eine niedrige Konzentration an CFSE (Carboxyfluorescein-Succinimidylester) enthielt, zu jeweils einer Fraktion hinzugefügt. Die SIINFEKL-versetzte Fraktion wurde mit 10 ml PBS, welches 10 µM CFSE enthielt, während die Fraktion mit reinem PBS mit 10 ml PBS, welches 1 µM CFSE enthielt, vermischt wurde. Dann wurden beide Fraktionen bei 37° C für 15 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde mit PBS, welches 1 % BSA enthielt, gestoppt. Die Lösung wurde zweimal mit PBS gewaschen, wobei nach dem ersten Waschschritt eine 10 µl Probe für die Durchflusszytometrie-Analyse entnommen wurde. Zeigte die Analyse, dass der Färbeprozess erfolgreich war, konnten die Lösungen so vermischt werden, dass die Endlösung die gleiche Anzahl von beiden Zelltypen enthielt. Die Zellen wurden gezählt und pro stimulierter Maus wurden $1x10^7$ Zellen *i.v.* injiziert. Die Milzen von den stimulierten Mäusen wurden nach 4 Stunden entnommen. Milzzellen wurden isoliert und aufgreinigt, indem RCB wie oben beschrieben genutzt wurde, um die roten Blutzellen zu entfernen. Danach wurde das Verhältnis von Zielzellen (CFSE hoch) zu Nicht-Zielzellen (CFSE niedrig) mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die *in vivo* Zytotoxizität konnte dann durch Vergleich der Proben, welche OVA/CpG erhalten hatte, zu einer Zielkontrolle, welche nur die Zielzellen erhalten hatte und daher keine zytotoxische Antwort zeigen sollte, ermittelt werden. Der Prozentsatz an OVA-spezifischer Zytotoxizität konnte wie folgt berechnet werden:

$$OVA - Spezifische\ Cytotoxizität\ (\%) = 100 - \frac{Probe\ \frac{\#high}{\#low}}{Unbehandelt\ \frac{\#high}{\#low}} \times 100$$

Induktion von NTN

Es wurden neben der Kontrollgruppe eine Versuchsgruppe gebildet, zusammengesetzt aus Mäusen, welche das nephrotoxische Schafserum erhielten. Das NTS wurde in 500 µl PBS (1.5 mg Serum pro g Körpergewicht) *i.p.* an Tag 0 injiziert. Nach 2 Tagen wurde der Urin der Mäuse mit Hilfe von *Combur* Teststreifen auf Proteinurie untersucht. 17 Stunden bevor die Mäuse an Tag 10 zur Untersuchung abgetötet worden, wurde mittels metabolischer Käfige der Urin bis zur Abtötung aufgesammelt. An Tag 10 wurden die Mäuse mittels CO_2 abgetötet, um die Nieren und das Herzblut zu entnehmen. Das Blut wurde abzentrifugiert und das Serum, sowie der gefilterte Urin zur Bestimmung der Kreatinin-Clearance und der GFR genutzt.

Isolation von Nierenzellen

Die entnommenen Nieren wurden zunächst von der Fettkapsel befreit und in 2 Hälften geschnitten, eine Hälfte wurde für die Isolation von Nierenzellen verwendet, die andere Hälfte zur Einbettung in Paraffin.
Eine entnommene Nierenhälfte wurde in eine Petrischale überführt, mit 1-2 ml Kollagenase A-Verdauungsmix versetzt und für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Die verdauten Nieren wurden mit einem Plastikstempel zerdrückt und es wurde für 30 Minuten bei 37° C auf einem Schüttler weiter inkubiert. Die Nierenzellsuspensionen wurden in 15 ml Falcon Röhrchen überführt und es wurden entweder 1/20 des Volumens für eine FACS-Zellfärbung oder 1/20 für eine Nierenzellkultur verwendet.

Periodsäure-Schiffs-Reagenz (PAS)-Nieren-Färbung

Eine entnommene Nierenhälfte wurde zunächst in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gefüllt mit 1 ml 4 %-ige PFA-Lösung für 3 Tage bei 4° C gelagert. Die Nierenhälfte wurde für 1 Tag unter fließendes Wasser gestellt, um die PFA-Reste entfernen zu entfernen zu können. Ethanol (77 %) wurde hinzugefügt, die Entwässerung gestartet und danach wurde die Nierenhälfte in heißem Paraffin eingebettet. Nach Abkühlung des Paraffinblocks konnte das Präparat mit einem Mikrotom in 5 µm dicke Scheiben geschnitten werden und über ein 40° C Wasserbad auf einen Glasobjektträger

übertragen werden. Die fertigen Objektträger wurden in eine Färbekammer gestellt, wo die Gewebeschnitte zunächst mit Xylol entparaffiniert worden. Es schloss sich eine absteigende Alkoholreihe zur Hydrierung an. Die Gewebeschnitte wurden mit destilliertem Wasser vor und nach 7-minütiger Oxidation mit 0,8 % Periodsäure gespült und anschließend für 10 Minuten mit dem Schiffs-Reagenz gefärbt. Nach zweimaligem Spülen in Sulfitwasser für 5 und 7 Minuten wurden die Schnitte wieder unter fließendem Aqua dest. gewaschen und zur Färbung der Zellkerne für 5 Minuten in Hämatoxylin eingelegt. Nach dem Bläuen unter lauwarmen Leitungswasser, spülen mit Aqua dest. und Dehydrierung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe, wurde Xylol hinzugefügt. Am Ende des Färbeprozesses wurde 1 ml Roti-Histokitt (Balsam) auf den Objektträger aufgetragen um diesen mit einem Deckgläschen zu versiegeln. Die Analyse der Nierenpräparate erfolgte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops (IX71, Olympus, Düsseldorf).

Induktion eines post-operativem Darmverschlusses (POI)

Eine Versuchsgruppe von C57BL/6 Mäusen wurde laparotomiert, dabei wurde lediglich der Darm offen gelegt und dieser dann druckvoll massiert, um einen post-operativem Darmverschluss einzuleiten. Die andere Versuchsgruppe als Kontrolle unterzog sich der gleichen Prozedur, jedoch wurde keine Darmmassage durchgeführt. Nach 2 Tagen wurde jeder Maus eine Sphäre oral verabreicht um auf POI zu testen. Danach wurde FITC-Dextran oral gegeben, um nach 90 Minuten den gastrointestinalen Trakt zu entnehmen. Der GIT wurde in folgende Fragmente zerlegt: Magen (M), 10 Stücke Dünndarm (J1-10), Zäkum (Z), 3 Stücke Dickdarm (C1-3). Die 15 Fragmente wurden in 1.5 ml Eppendorfgefäße überführt, welche 1 ml enthielten. Der Inhalt der Fragmente wurde durch Ausspülen mit PBS erhalten. Dann wurden die Proben für 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in schwarze 96-*well*-Platten überführt. Der FITC-Dextrangehalt der einzelnen Proben wurde mit Hilfe des Fluoreszenzreaders (Safire, Tecan, Crailsheim, Deutschland) analysiert.

Virale Infektion von OT-I-Rag$^{-/-}$-Mäusen

OT-I-Rag$^{-/-}$-Mäusen wurden 5x10^{8} PFU AdGOL über die Schwanzvene injiziert. Die Kontrollgruppe aus OT-I-Rag$^{-/-}$-Mäusen blieb unbehandelt. Das Überleben nach der Infektion wurde beobachtet.

Induktion eines Diabetes in RIP-mOVA-Mäusen

6 bis 8 Wochen alte RIP-mOVA-Mäuse wurden 5x10^{6} OT-I-Zellen in PBS durch Injektion in die Schwanzvene transferiert. Nach 12 Tagen wurde der Urin der Mäuse mit Hilfe von *Combur* Teststreifen auf Glukosurie untersucht. Bis zu einem Blutglukosewert von 160-180 mg/dl schaffen es die Nierentubuli die Glukose aus dem renalen Vorharn zurück ins Blut zu überführen. Bei höheren Werten und einem positiven Teststreifen liegt daher eine Inzidenz für Diabetes vor.

Statistische Ermittlungen

Die Ergebnisse werden als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (SD) angegeben. Vergleiche wurden mit Hilfe des *two-tailed Student's t-test* (Prism 4 und 7, Graphpad Software Inc., San Diego CA USA) durchgeführt.

Disclaimer

Die beschriebenen *in vivo* Experimente wurden alle von zuständigen Versuchsleitern des IMMEI mit den dazugehörigen genehmigten Versuchstieranträgen durchgeführt. Anschließend wurde die *in vitro* Probenverarbeitung, -behandlung und –analyse von mir durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Rottlerin inhibiert die Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen und folglich die T-Zellaktivierung *in vitro*.

Majewski et al. beschrieb eine Inhibition der klassischen Antigenpräsentation zu OT-II-Zellen durch Rottlerin *in vitro*. Ich fand auf dieser Grundlage zufällig heraus, dass Rottlerin die OT-I-Zellaktivierung *in vitro* hemmt. Daher versuchte ich diese Entdeckung zu verifizieren.

Um zu ermitteln welcher Mechanismus der Kreuz-Präsentation von löslichem OVA durch BM-DC an OT-I-Zellen durch Rottlerin inhibiert wird, wurden alle Schritte von der Antigenaufnahme, über die Antigenverarbeitung, -präsentation bis hin zur T-Zellaktivierung diesbezüglich untersucht.

Zunächst wurden $1x10^6$ C57BL/6-Knochenmarks-abgeleitete dendritische Zellen mit 250 ng/ml OVA-Alexa647 und entweder 20 µM DMSO oder 20 µM Rottlerin versetzt, für 2 Stunden inkubiert, um den Effekt von Rottlerin bzw. DMSO auf die Aufnahme von OVA in BM-DC zu bestimmen. Die BM-DC wurden vor der durchflusszytometrischen Analyse mit CD8α, CD11c-APC und F4/80-PE gefärbt. Die MFI (Mittlere Fluoreszenzintensität) im Alexa647-Kanal von $CD11c^+$-BM-DC wurde durchflusszytometrisch bestimmt und diente als Kriterium zur Bestimmung der Aufnahme von OVA durch BM-DC. Da Rottlerin in DMSO gelöst ist, wurde DMSO als Kontrollsubstanz verwendet, um einen möglichen Einfluss des Lösemittels auszuschließen. Vergleicht man die Versuchsgruppen OVA (MFI=3290), OVA+DMSO (MFI=3952) und OVA+Rottlerin (MFI=3092), so wurde sichtbar, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen der mittleren Fluoreszenz-Intensität (MFI) der BM-DC, die OVA-Alexa647 aufgenommen haben, gibt (OVA vs. OVA+DMSO, p=0.6674, OVA vs. OVA+Rottlerin, p=0.0887, OVA+DMSO vs. OVA+Rottlerin, p=0.1894, Abbildung 4.1 A).

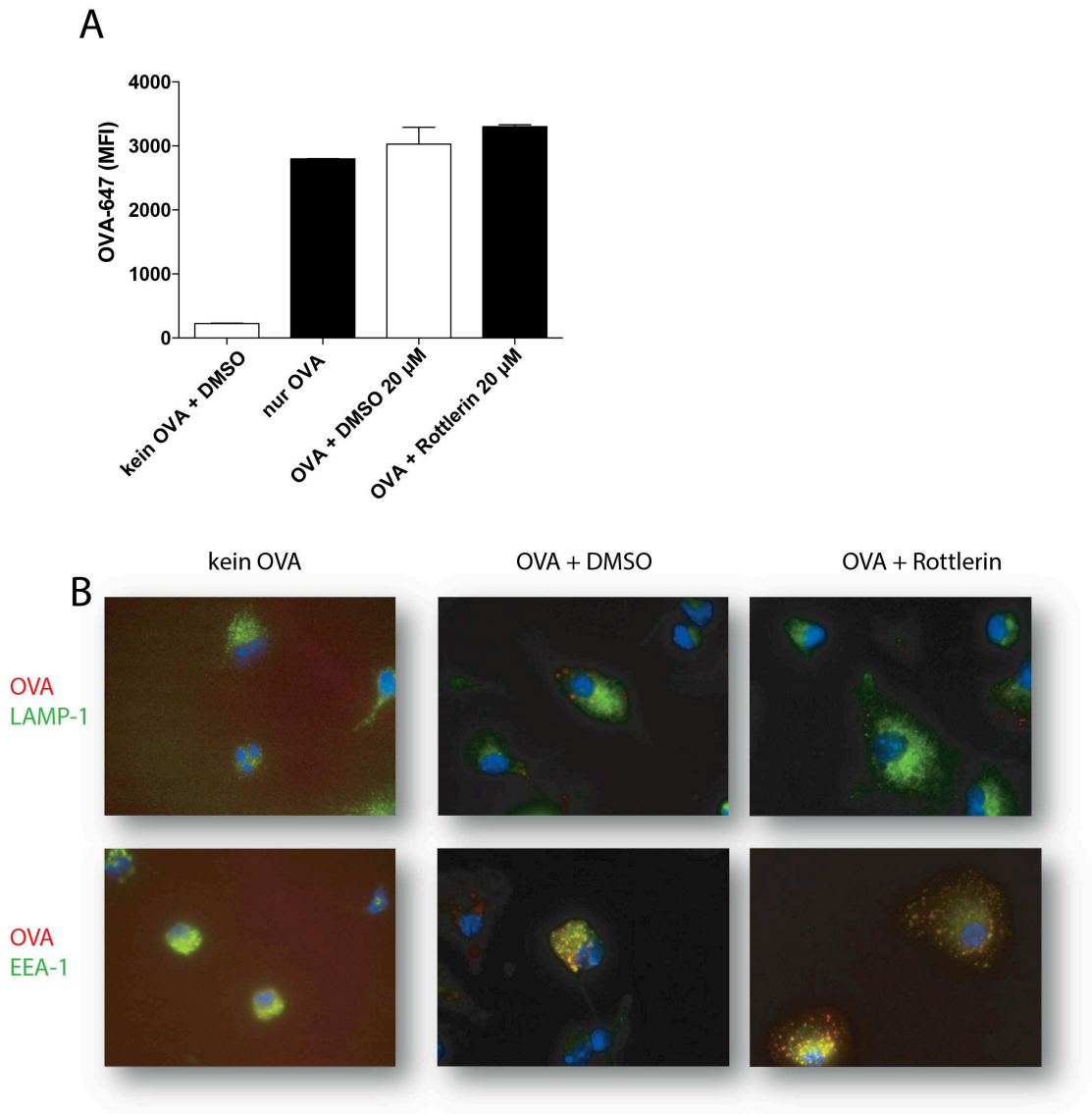


Abbildung 4.1: Der Einfluss von Rottlerin auf die OVA-Aufnahme und –prozessierung in BM-DC in vitro. *(A) C57BL/6-Knochenmark-Dendritische Zellen (10^6 Zellen) wurden entweder mit 250 ng/ml OVA-Alexa647 in 20 µM DMSO oder 20 µM Rottlerin (gelöst in DMSO) für 2 Stunden inkubiert. Als Negativkontrolle wurde lediglich DMSO und als Positivkontrolle lediglich OVA hinzugefügt. Die Zellen wurden mit CD8α, CD11c-APC und F4/80-PE gefärbt. (B) BM-DC wurden wie in A behandelt (OVA, rot) und dann für die Immunzytochemie genutzt. Die Zellen wurden entweder mit dem „stable early endosomal marker 1" (EEA-1) gefärbt, konjugiert mit FITC (grün) oder dem „lysosomal-associated protein 1" (LAMP-1), konjugiert mit FITC (grün), gefärbt. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.*

Um den Einfluss von Rottlerin auf die Antigenprozessierung zu testen, wurden BM-DC mit OVA-Alexa647 + DMSO oder OVA-Alexa647 + Rottlerin für 2 Stunden inkubiert. BM-DC ohne OVA dienten als Negativkontrolle. Danach wurden mittels einer Immunzytochemie die Zellen entweder für den „*stable early endosomal*

marker 1“ (EEA-1)-FITC oder den „*lysosomal-associated protein 1“* (LAMP-1)-FITC gefärbt. Die jeweiligen Proteine sind repräsentative Marker für die frühen Endosomen (EEA-1) oder die Lysosomen (LAMP-1), Zellkompartimente, in welchen unter anderem die Verarbeitung und Weiterleitung von Antigen stattfindet. Es konnten sowohl bei der Inkubation mit OVA+DMSO als auch bei der Inkubation mit OVA+Rottlerin eine Anreicherung von OVA (rot) in den EEA-1^+ (grün) Zellkompartimenten (Abbildung 4.1 B) beobachtet werden.

Im eigentlich initalen Experiment wurden BM-DC entweder mit 500 µg/ml OVA oder 1 µg/ml SIINFEKL und verschiedenen Konzentrationen von DMSO oder Rottlerin inkubiert, nach 2 h gewaschen und dann für 18 h mit OT-I-Zellen kokultiviert. SIINFEKL ist ein bereits verarbeitetes Peptid von OVA, welches direkt an die Oberflächenmoleküle an der Zelloberfläche binden kann und nicht wie vollständiges Antigen intrazellulär prozessiert werden muss. Auf den T-Zellen wurden die Aktivierungsmarker CD25 und CD69 fluoreszenz-markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Diese Versuche zeigten bei steigenden Konzentrationen von Rottlerin eine signifikante Reduktion an $CD25^+CD69^+$ aktivierten OT-I-Zellen trotz vorheriger Inkubation mit OVA im Vergleich mit DMSO-Gruppen. Diese zeigten keinerlei Reduktion der Aktivierung im Vergleich zur alleinigen OVA-Gabe. Die Negativkontrolle zeigte keine Aktivierung (Abbildung 4.2 A). Es gab bei einer Rottlerin-Konzentration von 5 µM nur eine $CD25^+CD69^+$-Aktivierung von 29,6 %, wohingegen diese bei der selbigen DMSO-Konzentration 90,55 % (p=0.0012) betrug. Bei 20 µM Rottlerin lag die Aktivierung bei nur 14,7 %, wohingegen bei DMSO 87,8 % (p=0.0008) gemessen wurden. Bei 40 µM Rottlerin lag die Aktivierung bei nur 9,72 %, wohingegen bei DMSO 88,73 % (p=0.0001) gemessen wurden. Mit SIINFEKL inkubierte BM-DC wiesen die gleiche (nicht signifikant veränderte) Reduktion der OT-I-Zellaktivierung unter Rottlerin (z.B. bei 40 µM, 6,64 %) wie mit OVA (9,72 %, p=0.1786) auf (Abbildung 4.2 B). Dieses Resultat bestätigt, dass Rottlerin nicht in die Antigenverarbeitung eingreift, jedoch einen negativen Effekt auf die OVA-Präsentation und/oder die Aktivierung der OT-I-Zellen *in vitro* haben muss.

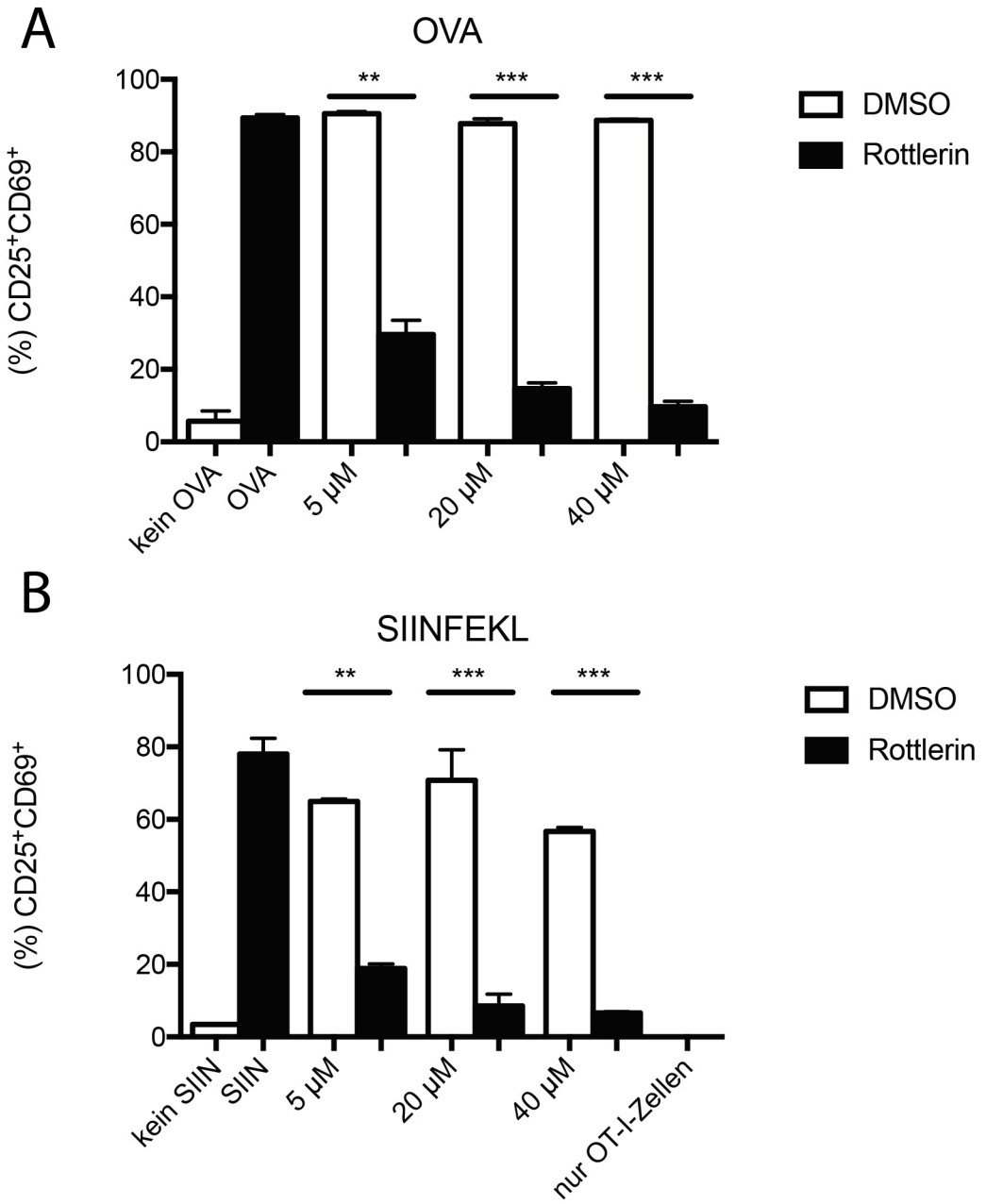


Abbildung 4.2: Rottlerin inhibiert die T-Zellaktivierung in vitro. *5 x 10^4 BM-DC wurden mit 500 µg/ml OVA (A) oder mit 1 µg/ml SIINFEKL (B), sowie verschiedenen Konzentrationen von DMSO oder Rottlerin inkubiert, gewaschen und dann kokultiviert mit 5 x 10^4 OT-I-Zellen. Nach 18 Stunden wurden die Zellen geerntet, gefärbt mit CD8α, CD11c und den T-Zellaktivierungsmarkern CD25 und CD69. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.*

Verschiedene Oberflächenmoleküle wie die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 sind neben der direkten Antigenpräsentation durch MHC-I, notwendig für die Aktivierung von naiven $CD8^+$-T-Zellen. Das vorherige Experiment legt einen negativen Effekt von Rottlerin auf die Aktivierung von OT-I-Zellen nahe, der durch eine reduzierte Antigenpräsentation erklärbar wäre. Um den spezifischen

Einfluss von Rottlerin genauer zu bestimmen, wurden BM-DC mit 10 µg/ml Lipopolysaccarid (LPS) und verschiedenen Konzentrationen von DMSO oder Rottlerin für 6 h inkubiert und danach die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD86 und OVA-Peptid-präsentierende MHC-I-Moleküle fluoreszenz-markiert. LPS stimuliert die Hochregulation von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen die für die T-Zellaktivierung wichtig sind (McAleer and Vella 2008). Durchflusszytometrische Untersuchungen zeigten bei steigenden Konzentrationen von Rottlerin bei allen Oberflächenmolekülen eine signifikante Reduktion der MFI im Vergleich zu den DMSO behandelten Zellen oder LPS alleine (Abbildung 4.1 D). Für CD40 wurden in der Negativ-Kontrolle 1128 MFI gemessen, nach LPS-Stimulation 3802 MFI und Rottlerin senkte bei einer Konzentration von 20 µM bsw. 60 µM im Vergleich zu DMSO die MFI auf 2068 (DMSO 3270, p=0.0046) bsw. 1571 (DMSO 3562, p=0.0003). Für CD80 wurden in der Negativ-Kontrolle 11098 MFI gemessen, nach LPS-Stimulation 19292 MFI und Rottlerin senkte bei einer Konzentration von 20 µM bsw. 60 µM im Vergleich zu DMSO die MFI auf 14701 (DMSO 19733, p=0.0110) bsw. 13036 (DMSO 19510, p=0.01). Für CD86 wurden in der Negativ-Kontrolle 3564 MFI gemessen, nach LPS-Stimulation 8533 MFI und Rottlerin senkte bei einer Konzentration von 20 µM bsw. 60 µM im Vergleich zu DMSO die MFI auf 5352 (DMSO 11813, p=0.001) bsw. 4242 (DMSO 7976, p=0.0004). Für MHC-I wurden in der Negativ-Kontrolle 8006 MFI gemessen, nach LPS-Stimulation 10608 MFI und Rottlerin senkte bei einer Konzentration von 20 µM bsw. 60 µM im Vergleich zu DMSO die MFI auf 6313 (DMSO 11096, p=0.0045) bsw. 5395 (DMSO 8056, p=0.0296). Zusammen mit den vorherigen Experimenten konnte daher ein spezifischer negativer Einfluss von Rottlerin auf die Hochregulation der kostimulatorischen Oberflächenmolekülen CD40, CD80 und CD86, sowie das Antigen-präsentierende Molekül MHC-I bei vorheriger Stimulation, nicht aber auf die Antigenaufnahme und -prozessierung, nachgewiesen werden.

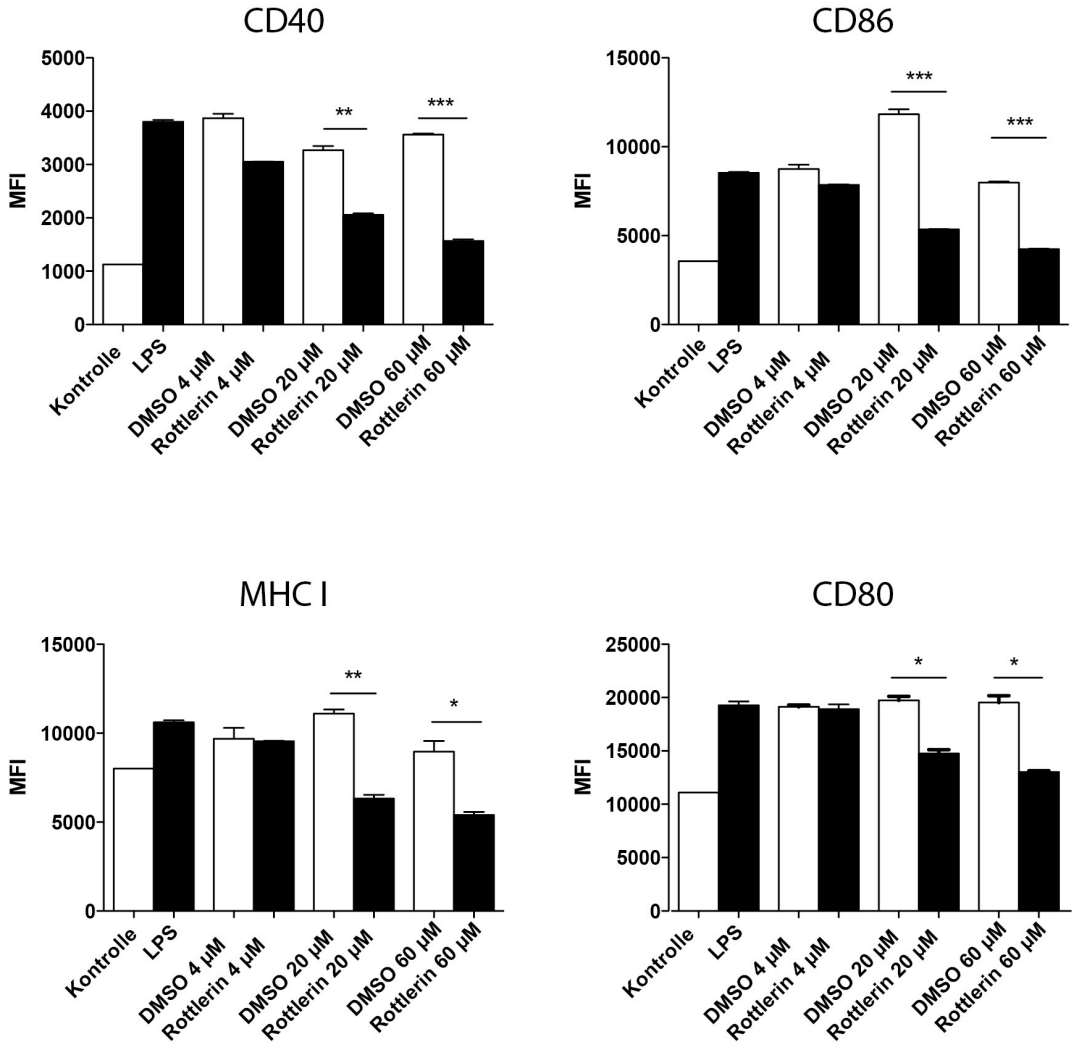


Abbildung 4.3: Rottlerin inhibiert die Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen in vitro. *BM-DC (10^6 Zellen) wurden mit 10 µg/ml LPS und verschiedenen Konzentrationen von DMSO oder Rottlerin inkubiert. Nach 6 Stunden wurden die Zellen geerntet und mit CD11c, CD40, CD80, CD86 und MHC-I gefärbt. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.*

4.2 Rottlerin blockiert direkt die T-Zellaktivierung und hat zudem einen negativen Effekt bei der BM-DC vermittelten T-Zellaktivierung *in vitro*.

Mit den Ergebnissen aus 4.1 konnte zwar ein Einfluss von Rottlerin auf die T-Zellaktivierung gezeigt werden, jedoch nicht ob dieser indirekt oder direkt vermittelt ist.

Zunächst wurde das Experiment aus Abbildung 4.2 B wiederholt, dabei jedoch dem Waschschritt mit PBS eine Fixierung der BM-DC mit Glutaraldehyd vorgezogen. Damit sollte sichergestellt werden, dass kein Rottlerin mehr aus den Zellen hätte austreten können, um die OT-I-Zellen direkt zu beeinträchtigen (Abbildung 4.4 A). Vergleicht man die $CD25^{+}CD69^{+}$-Aktivierung der OT-I-Zellen bei 20 µM Rottlerin von unfixierten (Abbildung 4.2 B) mit den fixierten BM-DC (Abbildung 4.4 A) werden nur 16,2 % OT-I-Zellen bei den unfixierten BM-DC aktiviert, wohingegen 40 % bei den fixierten BM-DC aktiviert werden. Die Ergebnisse könnten somit nahelegen, dass Rottlerin über die Inhibition der Hochregulation von MHC-I und der kostimulatorischen Moleküle die OT-I-Zellaktivierung reduziert oder/und auch einen direkten Effekt auf die OT-I-Zellaktivierung hat.

Daher wurde zur Bestätigung eines direkten Effekts auf die T-Zellaktivierung zusätzlich eine 96-Lochplatte mit anti-CD28 und absteigenden Konzentrationen von anti-TCRβ („*T-cell receptor*“) für eine Nacht beschichtet, danach wurden BM-DC und Rottlerin für 2 h hinzugegeben. OT-I-Zellen wurden für weitere 18 Stunden hinzugefügt und nach Fluoreszenz-Markierung durchflusszytometrisch analysiert. Anti-CD28 und anti-TCRβ sorgen für eine direkte Stimulation bsw. Hochregulation der T-Zellaktivierungsmarker CD25 und CD69 und ersetzen somit die klassische APC.

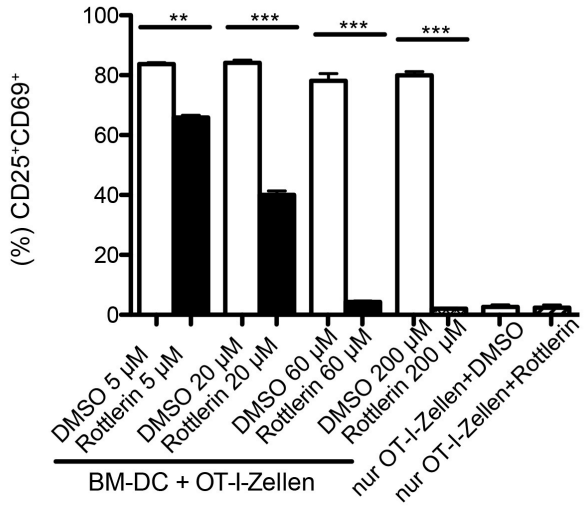
Bei einer Gruppe, welche BM-DC und später OT-I-Zellen enthielt, wurde das Rottlerin, welches sich in der Lösung befand vor der Zugabe der OT-I-Zellen mit PBS ausgewaschen (gelbe Quadrate). Die gewaschene Lösung könnte jedoch noch immer Rottlerin enthalten, da die Möglichkeit besteht das es aus den BM-DC austritt. Daher wurde eine weitere Gruppe, bei der die Zellen nach dem Waschen mit Glutaraldehyd fixiert wurden (blaue Dreiecke), untersucht. Als Positivkontrolle wurde eine Gruppe mit BM-DC und OT-I-Zellen, jedoch ohne Rottlerin gewählt, welche eine maximale Aktivierung bei steigender AK-Konzentration zeigte (grüne Dreiecke). Die Negativkontrolle enthielt BM-DC und OT-I-Zellen, welche nach der Inkubation mit

Rottlerin für 2 Stunden, erneut Rottlerin erhielten (schwarze volle Punkte). In dieser Gruppe konnte unabhängig von der verwendeten Antikörperkonzentration keine Aktivierung der OT-I-Zellen festgestellt werden. Bei steigender Antikörperkonzentration ergab sich bei der unfixierten (gelbe Quadrate) und fixierten (blaue Dreieicke) Gruppe jeweils eine reduzierte OT-I-Zellaktivierung, wobei die Aktivierung der gewaschenen unfixierten Gruppe im Vergleich stärker reduziert war (gelbe Quadrate vs. blaue Dreieicke). Die unfixierte Gruppe muss also Rottlerin aus den BM-DC ausgeschüttet haben und zeigt somit, dass Rottlerin auch direkt die OT-I-Zellaktivierung inhibiert, da die BM-DC in diesem Experiment nicht an der Aktivierung der OT-I-Zellen beteiligt sind.

Eine weitere Gruppe enthielt nur OT-I-Zellen und Rottlerin (Abbildung 4.4 B, schwarze durchsichtige Punkte) und die dazugehörige Kontrollgruppe nur OT-I-Zellen (rote Punkte). Bei der Kontrollgruppe war bei steigender Antikörperkonzentration eine steigende T-Zellaktivierung zu sehen, wohingegen bei der Gruppe mit Rottlerin eine Aktivierung ausblieb. Dieses Resultat verifiziert einen direkten negativen Einfluss von Rottlerin auf die T-Zellaktiverung *in vitro*.

Zusammen mit den Ergebnissen aus Abbildung 4.3 konnte einerseits die Wirkung von Rottlerin auf die BM-DC als auch direkt auf die Aktivierung der OT-I-Zellen nachgewiesen werden.

A



B

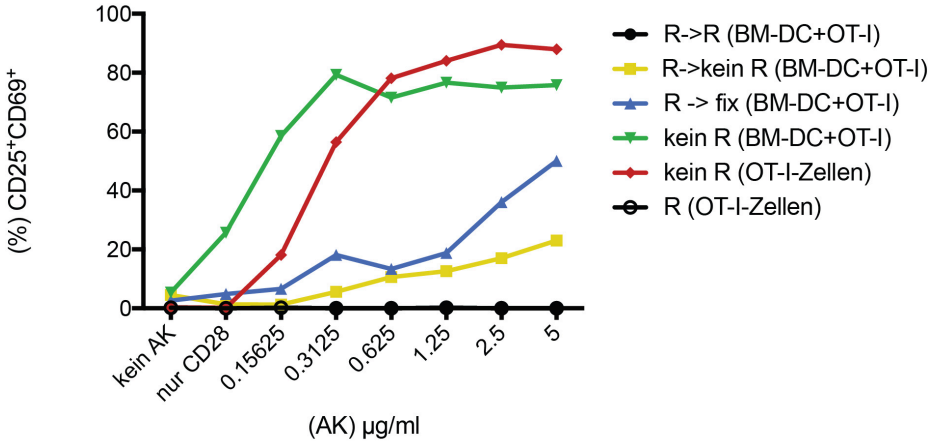


Abbildung 4.4: Rottlerin blockiert direkt die T-Zellaktivierung und hat zudem einen negativen Effekt bei der BM-DC vermittelten T-Zellaktivierung in vitro. *(A) 5 x 10^4 BM-DC wurden mit 1 µg/ml SIINFEKL inkubiert, mit 0.025 % Glutaraldehyd fixiert, Rottlerin durch Waschen mit PBS entfernt und dann kokultiviert mit 5 x 10^4 OT-I-Zellen, welche separat mit verschiedenen Konzentrationen von DMSO oder Rottlerin kultiviert wurden. Nach 18 Stunden wurden die Zellen geerntet und CD8α, CD11c und die T-Zellaktivierungsmarkern CD25 und CD69 gefärbt. (B) Eine 96-Lochplatte wurde mit anti-TCRβ und anti-CD28 mit absinkenden Konzentrationen von anti-TCRβ über Nacht beschichtet. Dann wurden für 2 Stunden 5 x 10^4 BM-DC mit 20 µM Rottlerin inkubiert. Eine Gruppe von BM-DC wurde mit 0.025 % Glutaraldehyd fixiert und Rottlerin durch Waschen mit PBS entfernt. Eine andere Gruppe von BM-DC wurde nur mit PBS gewaschen. Nach diesen Prozessen wurden 5 x 10^4 OT-I-Zellen für weitere 18 Stunden kokultiviert und wie in A weiter behandelt. Die Daten sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente.*

4.3: Testung und Etablierung von verschiedenen Tierkrankheitsmodellen für den späteren Einsatz von Rottlerin *in vivo*

Nachdem negative Effekte auf die T-Zellpräsentation und –aktivierung durch Rottlerin *in vitro* ermittelt worden, soll in der Zukunft geklärt werden, ob auch *in vivo* eine Reduktion der T-Zellaktivierung beobachtet werden könnte. Dazu wurden zunächst verschiedene Tiermodelle auf Funktionalität für einen späteren Einsatz von Rottlerin getestet, von denen bekannt ist, dass T-Zellantworten für das entsprechende Modell relevant sind.

4.3.1: Rottlerin als möglicher Inhibitor der OVA-spezifischen Zytotoxizität und der Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen *in vivo*

Zur Analyse einer möglchen *in vivo* Relevanz von Rottlerin in Bezug auf das „*Cross-priming*“ wurde WT-Mäusen 200 µg/Maus OVA und 20 µg/Maus CpG *i.v.* injiziert. Als Kontrolle dienten nicht injizierte WT-Mäuse. CpG dient als notwendiges Adjuvanz um die zytotoxische T-Zellantwort zu stimulieren. Am 5. Tag wurden CFSE-gefärbte Zielzellen (+SIINFEKL) und Kontrollzellen in die Mäuse transferiert, 4 Stunden später die Milzzellen isoliert und durchflusszytometrisch das Verhältnis von Ziel- zu Kontrollzellen analysiert (Abbildung 4.5 A, obere Graphen). Durch die Relation zwischen SIINFEKL-markierten Zielzellen, welche durch CTL getötet wurden und Kontrollzellen konnte die OVA-spezifische Zytotoxizität der $CD8^+$-T-Zellen gemessen werden. Die Wildtyp-Kontroll-Gruppe (58,75 %) wies dabei eine signifikante Steigerung (t-Test, p=0.0001) im Vergleich zur unbehandelten Wildtyp-Gruppe (0 %) auf (Abbildung 4.5 A, unterer Graph).
Resultierend daraus kann darauf geschlossen werden, das Wildtyp-Mäuse nach der Injektion von OVA/CpG in der Lage sind „*Cross-priming*“ von DC zu zytotoxischen $CD8^+$-T-Zellen durchzuführen.

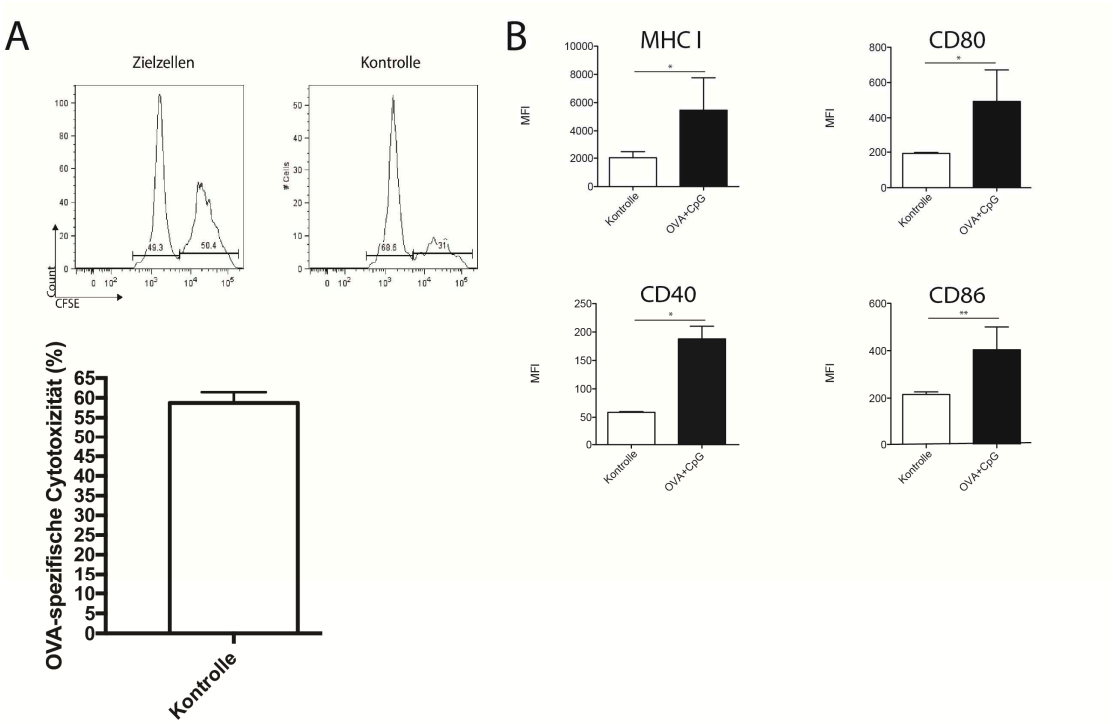


Abbildung 4.5: Modellierung der OVA-spezifischen Zytotoxizität und der Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen in vivo. *(A) Wildtyp-Mäusen wurde OVA (200 µg/Maus)/CpG (20 µg/Maus) injiziert. 5 Tage später wurden in diese Wildtyp-Mäuse, sowie in nicht infizierte Mäuse als Kontrolle CFSE-gefärbte Zielzellen transferiert. (B) Wildtyp-Mäusen wurde OVA (200 µg/Maus)/CpG (20 µg/Maus) injiziert. Nach 18 Stunden wurden isolierte Splenozyten isoliert und MHC-I und die kostimulatorischen Molekülen CD40, CD80 und CD86 gefärbt. Die Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.*

Neben einem möglichen Effekt von Rottlerin auf das „*Cross-priming*“ *in vivo* sollte ein Versuch etabliert werden mit dem man später den Einfluss von Rottlerin auf die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD86 und dem Peptidpräsentationsmolekül MHC-I von DC *in vivo* untersuchen kann. Dazu wurden wie im vorherigen Versuch WT-Mäuse OVA/CpG *i.v.* injiziert oder für die Kontrollgruppe unbehandelt gelassen. 18 Stunden nach der Stimulation wurden die Milzzellen isoliert und für $CD8^+CD11c^+$ DC durchflusszytometrisch untersucht. Auf den $CD8^+CD11c^+$ DC wurden die oben genannten Oberflächenmoleküle Fluoreszenz-markiert und die MFI bestimmt. DC der OVA/CpG-Gruppe wiesen bei allen Oberflächenmolekülen erhöhte MFI im Vergleich zu der Kontrollgruppe auf (Abbildung 4.5 B). Für CD40 wurde in der Kontrolle eine MFI von 59 gemessen, im Vergleich zur OVA/CpG-Gruppe gab es eine signifikante Steigerung der MFI von 59 auf 189 (t-Test, p=0.016). Für das Oberflächenmolekül CD80 wurde in der Kontrolle

eine MFI von 193 gemessen, im Vergleich zur OVA/CpG-Gruppe gab es eine signifikante Steigerung der MFI von 193 auf 479 (t-Test, p=0.013). Für CD86 wurde in der Kontrolle eine MFI von 215 gemessen, im Vergleich zur OVA/CpG-Gruppe gab es eine signifikante Steigerung der MFI von 215 auf 404 (t-Test, p=0.0072). Für MHC-I wurde in der Kontrolle eine MFI von 2031 gemessen, im Vergleich zur OVA/CpG-Gruppe gab es eine signifikante Steigerung der MFI von 2031 auf 5550 (t-Test, p=0.02).
Schlussfolgernd daraus kann durch die Injektion von OVA/CpG eine Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD86 und das MHC I-Molekül *in vivo* gewährleistet werden.

4.3.2: Möglicher regulatorischer Effekt von Rottlerin in einem Tiermodell des post-operativen Ileus

Um eine *in vivo* Relevanz von Rottlerin nicht nur auf Basis-*in vivo*-Modelle, wie in den vorherigen Experimenten durchgeführt, nachzuweisen, sollten nun verschiedene *in vivo*-Krankheitsmodelle für einen möglichen Effekt von Rottlerin getestet werden.
Bei dem ersten Krankheitsmodell wurde der Dünndarm von WT-Mäusen intraoperativ manipuliert um einen post-operativen Ileus (POI) zu induzieren. Die Dünndarmmanipulation führt zunächst zu einer T-Zellvermittelten Entzündungsreaktion, welche dann in einen post-operativen Ileus übergehen kann und einen möglichen Ansatzpunkt für eine Intervention mit Hilfe von Rottlerin darstellen könnte (Koscielny, Engel et al. 2013). Eine Versuchsgruppe erhielt eine Laparatomie mit anschließender Dünndarmmassage und die Kontrollgruppe wurde nur laparatomiert. Am Folgetag wurde den Versuchsgruppen FITC-Dextran *p.o.* verabreicht und 90 Minuten später der Darm entnommen und für eine Durchflusszytometrie in einzelne anatomische Abschnitte unterteilt. FITC-Dextran dient als Parameter zur Beurteilung des Schweregrades des POI. Daten von unbehandelten Tieren zeigen, dass FITC-Dextran die Darmpassage ungehindert durchläuft und es wären erhöhte Fluoreszenzwerte in den hinteren Dünndarmabschnitten im Bereich des Caecums zu erwarten. Bei einer intestinalen Motilitätsstörung könnte das FITC-Dextran die Darmpassage nur langsamer passieren und in den vorderen Darmabschnitten akkumulieren (Vilz, Overhaus et al. 2012). Bei bei der Manipulationsgruppe sind erhöhte Fluoreszenzwerte in den vorderen

Dünndarmabschnitten des Jejunums zu erkennen und bei der Kontrollgruppe eine Verschiebung in die hinteren Dünndarmschnitte bis hin zum Dickdarmanfang (Abbildung 4.6, manipulierter Darm, rot, Kontrolle, schwarz).

Daraus lässt sich erschließen, dass in der Gruppe mit manipulierten Darm eine Darmpassagestörung ausgelöst wurde, welche bei Anwendung von Rottlerin möglicherweise abgeschwächt werden könnte.

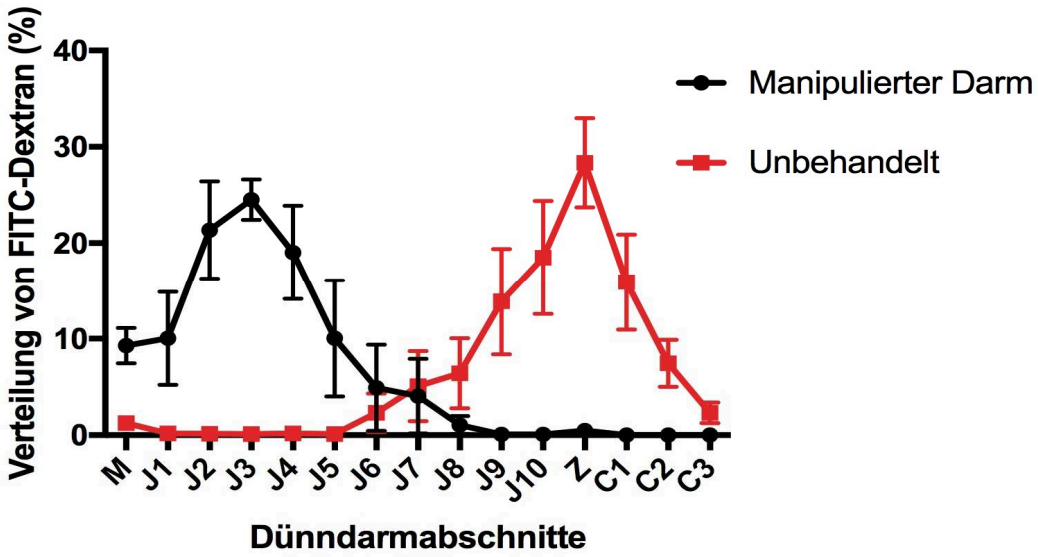


Abbildung 4.6: Modellierung eines post-operativen Ileus. *Wildtyp-Mäuse wurden einer Laparatomie und einer anschließenden Dünndarmmanipulation zur Provokation eines post-operativen Ileus unterzogen. Am Folgetag wurden die Mäuse mit FITC-Dextran gefüttert und 1,5 h später der Darm reseziert und in 15 physiologische Abschnitte aufgetrennt. Die Verteilung des FITC-Dextran dient bei der anschließenden Durchflusszytometrie als Parameter zur Beurteilung des Schweregrades des POI. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.*

4.3.3: Induktion eines akuten Leberversagens bei OT-I-Mäusen mittels Adenovirus als mögliches Modell zur Rottlerin-Anwendung

In einem weiteren *in vivo*-Modell sollte die Frage geklärt werden, ob Rottlerin einen Einfluss auf das Überleben von Mäusen haben könnte, welche mit einem Adenovirus infiziert wurden. Transgene OT-I-Mäuse wurden mit einem replikationsdefizienten

Adenovirus, welcher für die Proteine eGFP, OVA und Luciferase codiert (AdGOL) infiziert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte transgene OT-I-Mäuse. Die Adenoviren befallen Hepatozyten. Das im Virus codierte OVA wird in den infizierten Zellen prozessiert und über MHC-I als SIINFEKL selektiv OT-I-Zellen präsentiert. Die angelockten OT-I-Zellen töten die infizierten Hepatozyten ab. Durch die große Menge an Viruslast ($5x10^8$ PFU („*Plaque forming unit*“)) wird ein akutes Leberversagen induziert und die Mäuse können nur wenige Stunden bis Tage überleben (Ozbay Hoşnut, Canan et al. 2008, Welz, Eickhoff et al. 2018). In einer Überlebenskurve zeigte sich in der Adenovirus behandelten Gruppe ein Versterben der Mäuse innerhalb der ersten 48 Stunden (Abbildung 4.7). Wohingegen die Kontrollgruppe eine 100 %-ige Überlebensrate aufwies.
Rottlerin könnte die durchschnittliche Überlebenszeit der Mäuse verlängern und daher in diesem Modell einen Einfluss auf die zytotoxische T-Zellantwort haben.

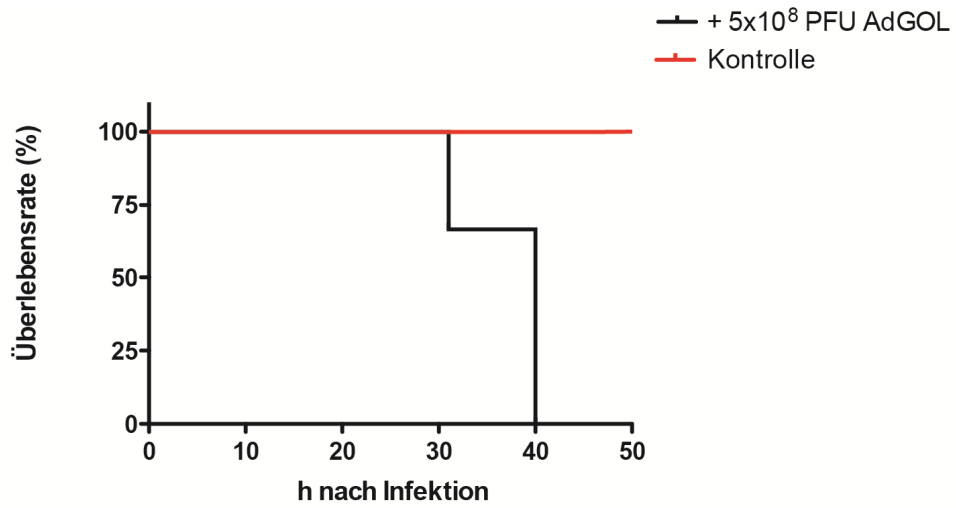


Abbildung 4.7: Induktion eines akuten Leberversagens bei OT-I-Mäusen mittels Adenovirus. *Transgene OT-I-Mäuse wurden mit 5 x 10^8 PFU AdGOL infiziert. Das Überleben wurde beobachtet. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.*

4.3.4: Induktion einer nephrotoxischen Nephritis mittels nephrotoxischem Scharfserum als mögliches Modell zur Rottlerin-Anwendung

Das *in vivo*-Modell der nephrotoxischen Nephritis (NTN) löst unter anderem eine T-Zellvermittelte Immunantwort in der Niere aus. Rottlerin könnte bei diesem Modell einen immunmodulierenden Effekt haben, dabei wurde ein Experiment gestartet, welches durch *i.p.* Injektion eines nephrotoxischen Schafserums (1.5 mg/g

KG) in WT-Mäuse die NTN auslösen sollte. Der Immunisierung folgt eine Immunantwort, welche $CD4^+$-T-Zellen aufgrund der Spezifität der Schaf-Immunglobuline für die Nierenrinde zur Niere lenkt. Die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen lockt mononukleäre Zellen an, welche die Glomeruli schädigen. Kompensatorisch proliferiert das Epithel der glomerulären Basalmembran und es kommt zur sogenannten Halbmondbildung (Timoshanko, Kitching et al. 2001). Am 9. Tag wurde der Urin zur Proteinurie-Bestimmung getestet. Danach wurden die Nieren für PAS-Färbungen vorbereitet und das Gewebe auf morphologische Hinweise einer NTN untersucht. Als Kontrollgruppe (KRTL) dienten nicht-infizierte WT-Mäuse. Bei der NTS-Gruppe (Protein im Urin=210 mg/dl) war dabei eine signifikante Proteinurie im Vergleich zur Kontrollgruppe (Protein im Urin=27,5 mg/dl) und zum Referenzwert für Proteinurie von 15 mg/dl feststellbar (Abbildung 4.8 A). Hohe Proteinurie-Werte sprechen dabei für eine reduzierte Nierenfunktion, welche mit dem Ausbruch der NTN assoziiert sein kann. In der PAS-Färbung konnte man bei der NTS-Gruppe verdickte Basalmembranen der Glomeruli (Halbmonde) erkennen (Abbildung 4.8 B, unterer Schnitt). Außerdem sind vermehrte Ablagerungen von Proteinzylindern auf der gesamten Schnittfläche zu erkennen. Diese morphologischen Auffälligkeiten sind deutliche Hinweise für eine NTN. Im Gegensatz dazu sind in der Kontrollgruppe, weder eine Verdickung der Basalmembran der Glomeruli, noch vermehrte Ablagerungen von Proteinzylindern zu erkennen (Abbildung 4.8 B, oberer Schnitt).

Dieses Experiment zeigte, dass bei der NTS-Gruppe die Parameter für den Ausbruch einer NTN auftraten und somit Rottlerin als möglicher Inhibitor einen abschwächenden Effekt auf den immunologischen Prozess der NTN haben könnte.

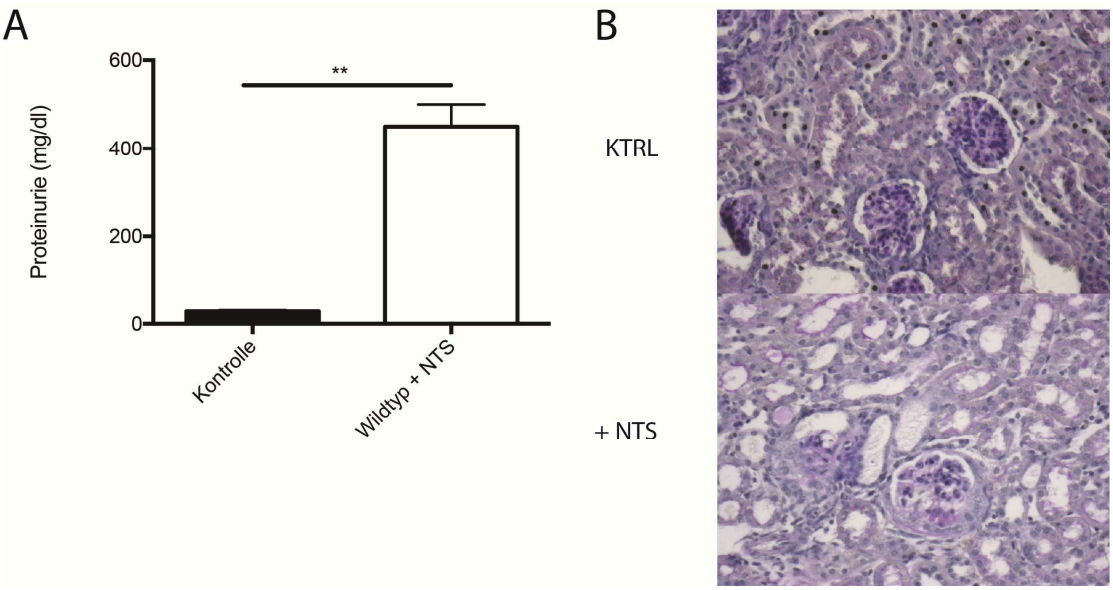


Abbildung 4.8: Induktion einer nephrotoxischen Nephritis mittels NTS. *Wildtyp-Mäuse wurden mit 700 µl nephrotoxischem Schafserum (NTS) infiziert. Abschließend wurde die Proteinurie mit Urinteststreifen (A) bestimmt, die Nieren entfernt und eingebettet in Paraffin um eine PAS-Färbung durchzuführen (B, oberer Teil ohne NTS, unterer Teil mit NTS). Das Experiment wurde zwei mal mit 4 Kopien pro Gruppe durchgeführt.*

4.3.5: Diabetische Entwicklung in RIP-mOVA-Mäusen nach Injektion von OT-I-Zellen als mögliches Modell zur Rottlerin-Anwendung

In einem letzten Experiment wurde die Entwicklung von autoimmunem Diabetes in RIP-mOVA-Mäusen untersucht. Dazu wurden 6 bis 8 Wochen alte RIP-mOVA-Mäuse $5x10^6$ OT-I-Zellen *i.v.* injiziert. Die in RIP-mOVA-Mäusen enthaltenen β-Zellen sind mit OVA beladen und damit Ziel der transgenen OT-I-Zellen. Mit Zerstörung der β-Zellen durch OT-I-Zellen kommt es zu einer diabetischen Diathese. Am 12. Tag wurde der Urin der einzelnen Versuchsgruppen mittels Teststreifen auf Glukose getestet. Ab einem Wert von 160-180 mg/dl zeigt sich der Teststreifen positiv für Glukose, was für Diabetes sprechen würde. Als Negativkontrolle wurden die Mäuse ohne OT-I-Zellinjektion belassen. Es zeigte sich eine starke Diabetesinzidenz (100 %) bei der Gruppe, welche OT-I-Zellen erhielt, jedoch kein Auftreten von Diabetes bei der Kontrollgruppe (0 %, Abbildung 4.4). Rottlerin könnte somit einen reduzierenden Einfluss auf das Auftreten von Diabetes in diesem *in vivo*-Modell haben.

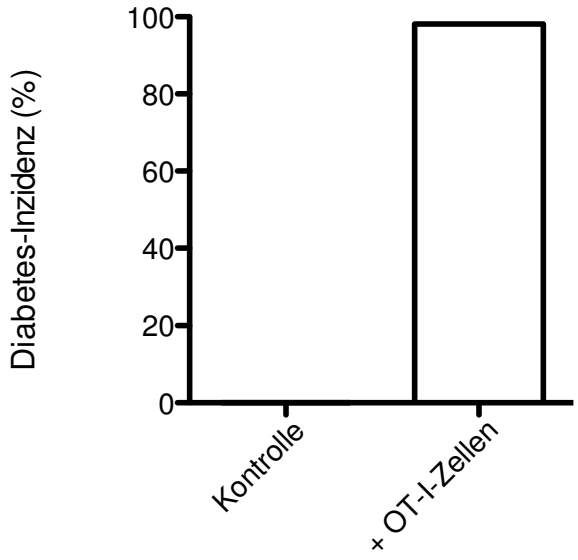


Abbildung 4.9: Diabetische Entwicklung in RIP-mOVA-Mäusen nach Injektion von OT-I-Zellen. *RIP-mOVA-Mäuse wurden $5x10^6$ OT-I-Zellen i.v. injiziert. Nach 12 Tagen wurde der Urin auf Glukose mittels Teststreifen untersucht. Eine Kontrollgruppe wurde nicht behandelt. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.*

5. Diskussion

Ziel des hier vorgestellten wissenschaftlichen Projektes war es zu untersuchen ob der PKCδ (Proteinkinase C δ)-Inhibitor Rottlerin immunmodulatorische Eigenschaften im Bezug auf die Kreuzpräsentation von löslichem Antigen an T-Zellen besitzt. Weiterhin sollte untersucht werden welche Mechanismen der Kreuzpräsentation durch Rottlerin moduliert werden und ob solche potentiellen, immunmodulatorischen Effekte auch *in vivo* beobachtet werden könnten.

Grundlage dieses Projektes waren Veröffentlichungen, die nahelegten, dass Rottlerin einen modulierenden Einfluss auf die klassische Präsentation von löslichem Antigen haben kann: *Majewksi et al.* zeigte beispielsweise, dass Rottlerin die Präsentation von löslichem OVA über MHC-II an $CD4^+$-T-Zellen *in vitro* inhibieren kann (Majewski, Bose et al. 2007). Wir vermuteten, dass dies ebenso für die Kreuzpräsentation von löslichem OVA gelten könnte.

Neben dem Befund, dass Rottlerin Einfluss auf die OVA-spezifische Kreuz-Präsentation zu $CD8^+$-T-Zellen hatte, war das Ziel der Doktorarbeit den zellulären Wirkungsort und Mechanismus *in vitro* aufzudecken. Die Ergebnisse bestätigten die Literaturdaten und konnten den Wirkmechanismus von Rottlerin eingrenzen. Zudem konnten *in vivo*-Modelle für das „*Cross-Priming*" von DC zu $CD8^+$-T-Zellen und die Stimulation kostimulatorischer Moleküle auf DC in WT-Mäusen etabliert werden für eine zukünftige Anwendung von Rottlerin auf diese Modelle. Abschließend konnte die Funktionalität von bestimmten Tiermodellen mit relevanten $CD4^+$- oder $CD8^+$-T-Zellvermittelten pathologischen Immunreaktionen demonstriert werden, welche durch die immunmodulatorischen Effekte von Rottlerin beeinflusst werden könnten.

Im Folgenden wird zunächst der Einfluss von Rottlerin auf die Antigenaufnahme, -verarbeitung und -präsentation *in vitro* diskutiert. Im Anschluss daran wird die mögliche Wirkungsweise von Rottlerin auf verschiedene *in vivo*-Prozesse besprochen. Zuletzt wird der potentielle Wert von Rottlerin als mögliches Immunsuppressivum erörtert.

5.1 Rottlerin inhibiert die Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen und folglich die Aktivierung von T-Zellen *in vitro*

Majewski et al. erbrachte den Nachweis, dass die Aktivierung von PKCδ durch PMA (*Phorbol-12-myristat-13-acetat*) keinen Einfluss auf die Antigenaufnahme und -verarbeitung über den MHC-II-Weg hatte (Majewski, Bose et al. 2007). Dabei verwendete er ein Modell von Knochenmarks-DC aus Mäusen, welche ich auch als *in vitro*-Grundlage nutzte. Die Substanz Rottlerin wirkt nicht nur auf die PKCδ-Isoform, sondern auch auf weitere konventionelle und neuartige PKC-Isoformen. Jedoch exprimieren die für dieses Projekt verwendeten Maus-DC nur die Isoform PKCδ. *Majewski et al.* verwendete Rottlerin um spezifisch zu zeigen, dass die MHC-II-Peptid-Präsentation an der Zelloberfläche durch PKCδ-Inhibition supprimiert wird. Hier sollte daher untersucht werden, ob Rottlerin auch einen Einfluss auf den Kreuz-Präsentationsweg über MHC-I hat.

Zunächst untersuchte ich den Einfluss von Rottlerin auf die Antigenaufnahme und –verarbeitung über den MHC-I-Präsentationsweg (Abbildung 4.1 A+B). Die Antigenaufnahme von BM-DC wurde durch Inkubation von Fluoreszenz-markierten OVA getestet und die MFI bestimmt. Dabei zeigten die BM-DC, welche mit Rottlerin+OVA oder DMSO+OVA inkubiert wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe, bei der die BM-DC nur mit OVA inkubiert wurden, ähnliche MFI-Werte. Dies bedeutet, dass Rottlerin die OVA-Aufnahme nicht beeinflusste. Die Antigenverarbeitung wurde nach Aufnahme von Fluoreszenz-markierten OVA durch BM-DC mittels Immunzytochemie untersucht. Es wurde beschrieben, dass unter normalen Bedingungen über den Mannose-Rezeptor aufgenommenes OVA zur Kreuzpräsentation in de EEA-1^+ frühen Endosomen transportiert wird (López-Huertas, Mateos et al. 2011). Keine oder nur eine reduzierte Kolokalisation von OVA und den EEA-1^+-Zellkompartimenten in den Rottlerin behandelten BM-DC würde auf eine Modulation der Antigenprozessierung hinweisen. Dies war aber im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche OVA+DMSO erhielt, nicht ersichtlich. Die Antigenaufnahme und -verarbeitung wurden daher nicht von Rottlerin inhibiert.

Andererseits konnte ich zeigen, dass die Hochregulation von MHC-I und der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 auf BM-DC nach Stimulation mittels LPS durch Rottlerin inhibiert wurden (Abbildung 4.3). Die kostimulatorischen Moleküle dienen neben der Interaktion von MHC-Peptidkomplex und TZR dabei als

ein notwendiges Signal zur erfolgreichen Aktivierung von T-Zellen. Somit konnte ich feststellen, dass neben den Effekten auf den MHC-II-Präsentationsweg, beschrieben von *Majewski et al.*, auch der MHC-I-Präsentationsweg durch Rottlerin supprimiert wird.

Des Weiteren musste geklärt werden, ob DMSO, in welchem Rottlerin gelöst wurde, einen möglichen Effekt auf die zellulären Interaktionen wie Antigenaufnahme, -prozessierung oder -präsentation haben könnte. Neben Beschreibungen von *de Abreu Costa et al.*, dass DMSO in niedrigen Konzentrationen keine zellulären Prozesse stört, wurden in den *in vitro*-Experimenten nachgewiesen, dass die Prozesse unter DMSO bei jeglicher Konzentration, ohne Rottlerin keine negativen Effekte auf die MHC-I-Signalkaskade hatten (de Abreu Costa, Henrique Fernandes Ottoni et al. 2017). Die OVA-Aufnahme, gemessen mittels Durchflusszytometrie, in BM-DC, die OVA-Prozessierung in den Zellkompartimenten, untersucht mittels Immunzytochemie, als auch Expression von MHC-I, CD40, CD80 und CD86, gemessen mittels Durchflusszytometrie, wurde nicht durch DMSO beeinflusst, so dass DMSO auch als Vehikel keinen Einfluss auf die erhobenen Datenpunkte hatte.

Es wurde bereits gezeigt, dass Rottlerin keinen Einfluss auf die Aufnahme des Antigens hat, sehr wohl aber auf die Expression von MHC-I und der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86. Weiterhin sollte nun geklärt werden ob Rottlerin einen weiteren Einfluss auf die endogene Prozessierung des Antigens hat oder nur die Oberflächenpräsentation über MHC-I inhibiert. Dazu wurde SIINFEKL verwendet, ein OVA-Peptid, welches im Gegensatz zu OVA nicht prozessiert werden muss. BM-DC wurden dabei mit OVA oder SIINFEKL beladen, mit Rottlerin oder DMSO inkubiert, später mit OT-I-Zellen kokultiviert und deren T-Zellaktivierungsmarker CD25 und CD69 durchflusszytometrisch gemessen. Da bei externer Beladung die gleiche Reduktion wie bei interner Prozessierung zu beobachten war, kann man schließen, dass die interne Prozessierung nicht beeinflusst ist und die beobachteten Effekte einzig auf die reduzierte Expression der kostimulatorischen Oberflächenmoleküle unter Rottlerin-Gabe zurückzuführen ist. Zudem korrelierte die Inhibition der OT-I-Zellaktivierung mit der verwendeten Rottlerin-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle und DMSO. (Abbildung 4.2).

Zusammengefasst hat Rottlerin einen Einfluss auf die Expression der Oberflächenmoleküle CD40, CD80, CD86 und MHC-I. Die schwächeren

kostimulatorischen Signale resultieren in der Folge dann in einer Abnahme der OT-I-Zellaktivierung.

5.2 Rottlerin blockiert die T-Zellaktivierung auch auf T-Zellebene und hat zudem einen negativen Effekt bei der BM-DC vermittelten T-Zellaktivierung *in vitro*.

Um zu testen, ob Rottlerin lediglich auf die kostimulatorischen Moleküle der BM-DC und deren vermittelte OT-I-Zellaktivierung wirkt oder zusätzlich noch einen direkten inhibierenden Effekt auf die T-Zellen hat, wurden die BM-DC nach Inkubation mit Rottlerin fixiert. In den vorigen Experimenten wurden die BM-DC nach Inkubation mit Rottlerin mehrfach mit PBS gewaschen, um Rottlerin aus dem umgebenden Zellmedium zu entfernen. In diesem Versuchsaufbau war allerdings nicht auszuschließen, dass Rottlerin wieder aus den Zellen austreten und bei Kokultivierung mit den OT-I-Zellen diese direkt beeinflussen könnte. Die Feststellung, dass die Hochregulation von MHC-I und den kostimulatorischen Molekülen CD40, CD80 und CD86 auf BM-DC durch Rottlerin unterdrückt wird, ist zwar eine logische Erklärung für die Rottlerin-vermittelte Inhibition der T-Zellaktivierung, jedoch nicht notwendigerweise die einzige mögliche Erklärung: Ebenso könnte Rottlerin wie beschrieben aus den BM-DC austreten und einen direkten Einfluss auf die OT-I-Zellen haben. Die Steigerung der Zellpermeabilität mittels Fixierung sollte somit ausschließen, dass nach mehreren Waschgängen kein Rottlerin mehr aus den Zellen austritt und die OT-I-Zellen durch Rottlerin direkt beeinflusst werden. Im Vergleich von fixierten zu unfixierten BM-DC gab es eine Reduktion der OT-I-Zellaktivierung um 40,5 % bei einer Rottlerin-Konzentration von 20 µM. Es musste also aus den Zellen ausgetretenes Rottlerin für die stärkere Inhibition verantwortlich sein, welches die Aktivierung der OT-I-Zellen durch direkte Einwirkung auf die OT-I-Zellen hemmt. Mit diesem Versuch konnte einerseits gezeigt werden, dass Rottlerin direkt auf die BM-DC-vermittelte Peptidpräsentation wirkt, da es zu einer Reduktion der OT-I-Zellaktivierung im Vergleich kam (Abbildung 4.2 B und 4.4 A). Dies steht auch im Einklang mit den vorher beobachteten Effekten von Rottlerin auf die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 auf BM-DC. Andererseits bestätigte das beschriebene Experiment einen direkten inhibitorischen Einfluss von Rottlerin auf die T-Zellen im Kontext der

T-Zellaktivierung (Abbildung 4.4 B). Dies wurde zusätzlich durch eine Ausweitung des beschriebenen Versuchaufbaus demonstriert, in dem OT-I-Zellen direkt mittels der Antikörper anti-CD28 und anti-TCRβ stimuliert wurden. Die Rottlerin-vermittelte Inhibition der kostimulatorischen Moleküle spielte also in diesem Kontext keine Rolle. Bei OT-I-Zellen, die nicht mit Rottlerin inkubiert wurden, korrelierte die Aktivierung mit steigenden AK-Konzentrationen, wohingegen OT-I-Zellen, die Rottlerin erhielten, gar nicht aktiviert wurden. In welcher Form die OT-I-Zellaktivierung durch Rottlerin reguliert wird könnte durch die Untersuchung des TZR, der T-Zelloberflächenmoleküle CD3, CD8 und CD28 und der intrazellulären Aktivierungskaskade genauer erörtert werden.

Bei der T-Zellaktivierung spielen nicht nur die direkte Peptidpräsentation und das Zusammenspiel der kostimulatorischen Moleküle eine Rolle, sondern auch der Einfluss von Zytokinen und Chemokinen. Diese sind neben des TZR- und des kostimulatorischen Signals als weiteres T-Zellaktivierungs- und differenzierungssignals notwendig. Außerdem beeinflussen diese die T-Zellpolarisation (T_H1/T_H2). Die Arbeitsgruppe von *Lee at al.* zeigte, dass Rottlerin die Ausschüttung der Zytokine IL-6 und IL-8 in mit S100A9 aktivierten Monozyten signifikant reduziert (Lee, Park et al. 2016). Daher sollte die Wirkung von Rottlerin auf die sich während des T-Zellaktivierungsprozess ausschüttenden Zytokine und Chemokine untersucht werden. Diese Überlegungen könnten zudem auf andere Zytokin- und Chemokin-vermittelten Prozesse übertragen werden und dort den Einfluss von Rottlerin überprüfen.

5.3 Mögliche *in vivo* Relevanz von Rottlerin in verschiedenen Tiermodellen

Es stellte sich nun die Frage, ob Rottlerin nicht nur einen Effekt auf *in vitro* Prozesse aufweist, sondern sich auch *in vivo* eine ähnliche Wirkung nachweisen lassen könnte.

5.3.1: Rottlerin als möglicher Inhibitor für die OVA-spezifische Zytotoxizität und die Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen *in vivo*

Die bisher beschriebenen Versuche konnten einen inhibitorischen Effekt von Rottlerin auf die Aktivität von OT-I-Zellen demonstrieren. Weiterhin konnte gezeigt

werden, dass dieser Effekt durch zwei verschiedene Mechanismen zustande kam: Zum einen die Inhibition der Hochregulation von MHC-I sowie der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86. Zum anderen hatte Rottlerin eine direkte inhibitorische Wirkung auf die T-Zellen, welche allerdings im Rahmen dieses Projektes mechanistisch nicht weiter untersucht wurde. Als nächster Schritt wurden nun einfache *in vivo* Modelle untersucht, auf welche sich die *in vitro* Befunde durch Anwendung von Rottlerin in der Zukunft übertragen lassen könnten. Dazu wurden Wildtyp-Mäuse mit OVA und dem Adjuvanz CpG stimuliert und die Expression der zuvor beschrieben kostimulatorischen Moleküle auf Milz-DC durchflusszytometrisch untersucht. Weiterhin wurde mit Hilfe eines sogenannten „*in vivo kill*"-Assays die Fähigkeit von WT-Mäusen untersucht eine funktionelle CTL-Antwort zu induzieren.

Im „*in vivo kill"*-Assay wurde eine OVA-spezifische Zytotoxizität der $CD8^+$-T-Zellen von 58 % gemessen. Das gleiche Experiment könnte auch mit der Applikation von Rottlerin *i.v.* oder *p.o.* an Tag 0 und 1 oder nur an Tag 1 durchgeführt werden, sowie mit unterschiedlichen Konzentrationen von Rottlerin. In allen Fällen könnte sich eine Reduktion der Zytotoxizität zeigen und somit eine Inhibition der zytotoxischen Leistungsfähigkeit der $CD8^+$-T-Zellen. Der Applikationstag, -art und die Substanzkonzentration könnte nach dem größtmöglichen Effekt von Rottlerin für weitere Experimente gewählt werden. Daher könnten auch andere Applikationswege wie eine *intraperitoneale* Injektion oder eine *transdermale* Applikation eine Abnahme der OVA-spezifischen Zytotoxizität bewirken. Den optimalen Zeitpunkt und die optimale Frequenz einer Behandlung mit Rottlerin benötigt weitere Studien und könnte in zukünftigen Arbeiten abgehandelt werden. Da Rottlerin in DMSO gelöst ist, müsste auch immer eine Versuchsgruppe mit DMSO versetzt werden, um einen Effekt von DMSO alleine auszuschließen.

In vivo wurde weiterhin die Stimulation der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD86 und MHC-I auf DC mittels OVA/CpG untersucht, bei der sich eine Hochregulation beobachten ließ. Rottlerin könnte hier ähnlich wie bei den *in vitro* Experimenten eine Reduktion der Hochregulation nach Stimulation bewirken, vorausgesetzt man würde auch hier die passenden Applikationstag-, -art und Substanzkonzentration wählen. Die in beiden *in vivo* Experimenten erhobenen Daten könnten unter Rottleringabe zwar einerseits zeigen, dass die Kostimulation und die $CD8^+$-T-Zellaktivierung durch Rottlerin wie in den *in vitro* Experimenten reduziert

wird, andererseits könnte man über den zugrunde liegenden Mechanismus nur spekulieren, da eine Vielzahl anderer Zellen auch durch Rottlerin beeinflusst werden könnten. Ein Versuch, welcher den Effekt von Rottlerin auf T-Zellen direkt untersuchen könnte, wäre beispielsweise ein nächster logischer Schritt. Dazu wäre ein aufwendiger Versuch nötig, bei dem man zunächst $CD8^+$-DTR (Diphtherietoxin-Rezeptor)-Mäuse mittels Diphtherietoxin (DT) behandelt und somit die funktionellen $CD8^+$-T-Zellen depletiert. Durch MACS isolierte $CD8^+$-T-Zellen von WT-Mäusen werden mit Rottlerin in *in vitro*-Kultur inkubiert und danach in die $CD8^+$-DTR-Mäuse transferiert. Ein *„in vivo kill"*-Assay würde sich anschließen. Bei einer Reduktion der OVA-spezifischen Zytotoxizität bei der Rottlerin-Gruppe im Vergleich zu einer unbehandelten $CD8^+$-DTR-Mausgruppe wäre nachgewiesen, dass Rottlerin direkt auf $CD8^+$-T-Zellen *in vivo* wirkt.

5.3.2 Mögliche immunologische Relevanz von Rottlerin auf verschiedene *in vivo*-Krankheitsmodelle

Nachdem die vorangegangenen Experimente demonstriert haben, dass man die immunmodulatorische Eigenschaft von Rottlerin auch *in vivo* einsetzen könnte, sollte abschließend überprüft werden, ob die Funktionalität von verschiedenen Tiermodellen von T-Zellvermittelten Erkrankungen für die Anwendung von Rottlerin genutzt werden könnte, um bei zukünftiger Rottleringabe zur Verbesserung des Krankheitsbildes beizutragen. Dabei wurden nicht nur $CD8^+$-T-Zell-abhängige Krankheiten untersucht, sondern auch $CD4^+$-T-Zell-abhängige Modellsysteme.

Ein $CD4^+$-T-Zell-abhängiges Modell stellt die Induktion eines post-operativen Ileus dar. Zusammengefasst löst eine mechanische Manipulation des Dünndarms eine $CD4^+$-T-Zellvermittelte Immunantwort aus. Dabei werden $CD103^+CD11b^+$-DC aktiviert und produzieren IL-12, welches die Sekretion von IFN-γ durch $CCR9^+$-Gedächnis-T_H1-Zellen unterstützt. IFN-γ aktiviert subsequent Makrophagen. Resultierend daraus kann es zur Ausbildung eines post-operativen Ileus kommen (Engel, Koscielny et al. 2010). Durch eine Inhibition der Aktivierung von $CD4^+$-T-Zellen durch Rottlerin könnte dieser Prozess vorzeitig gestoppt werden. Zum Nachweis der Ileussymptomatik wurden WT-Mäuse einer Laparotomie unterzogen, der Dünndarm mit den Fingern massiert und die Bauchdecke mit Nähten verschlossen. Einen Tag später wurde den Mäusen FITC-Dextran *per os* verabreicht,

um die Darmaktivität als Maß für die Ausbildung eines post-operativen Ileus zu bestimmen. FITC-Dextran sammelt sich je nach Darmmotilität in verschiedenen Darmabschnitten an – im Falle eines post-operativen Ileus ist die Darmaktivität verlangsamt und damit entsprechend die Passage des FITC-Dextrans. Dieses sammelt sich daher in den vorderen Darmabschnitten an. Es zeigte sich in der Gruppe mit Darmmanipulation eine Anreicherung von FITC-Dextran in den vorderen Dünndarmabschnitten und somit eine Ileussymptomatik. Eine Kontrollgruppe hätte eine Anreicherung von FITC-Dextran in den hinteren Dünndarmabschnitten ergeben, was in meiner Kontrollgruppe auch eingetreten ist (Vilz, Overhaus et al. 2012). Die Anwendung von Rottlerin müsste bei diesem Modell mit Bedacht gewählt werden, da z.B. die orale Gabe nach der Laparatomie durch den induzierten post-operativen Ileus die Aufnahmefähigkeit der Enterozyten lähmen könnte und Rottlerin somit keine Wirkung auf die Immunzellen entfalten könnte. Andererseits wäre Rottlerin durch die orale Gabe direkt am Ort der Inflammation, welche zur intestinalen Dysmotilität führt und nimmt ihren Ursprung durch die Induktion von Immunzellen in der *Muscularis externa* (Vilz, Overhaus et al. 2012) hat. Diese Annahme korreliert mit der Arbeitsgruppe von *Müller et al.*, welche zeigte, dass die orale Gabe von Kaffee kurz nach einer Kolektomie, welche einen POI auslösen kann, eine Reduktion bewirken kann (Müller, Rahbari et al. 2012). Das Experiment sollte zusätzlich mit verschiedenen Adjustierungen in der zeitlichen Applikation von Rottlerin und der Darreichungsform wiederholt werden, um entweder final eine Wirkung von Rottlerin auszuschließen oder zu bestätigen.

Ein Experiment, bei dem das Überleben transgener OT-I-Mäuse bei stattgefundener AdGOL-Virusinfektion ermittelt wird, stellt ein $CD8^+$-T-Zell-abhängiges Krankheitsmodell dar. Der replikationsdefizente Adenovirus, welche unter anderem für OVA codiert, infiziert Hepatozyten, welche das OVA exprimieren, prozessieren und dann über MHC-I als SIINFEKL den OVA-spezifischen OT-I-Zellen präsentieren. Dies führt dann zu einer Aktivierung der OVA-spezifischen CTL und zu einem CTL-induzierten Zelltod der Hepatozyten. Durch die Gabe einer großen Menge an Virus ($5x10^8$ PFU) wird durch die Vielzahl abgetöteter Hepatozyten ein akutes Leberversagen ausgelöst und die Mäuse versterben innerhalb von Stunden bis wenigen Tagen nach Infektion. In meinem experimentellen Versuchsaufbau lag die maximale Überlebensdauer der infizierten Mäuse unter 48 Stunden. Initial könnte eine prophylaktische Gabe von Rottlerin

vielversprechend sein. Durch das schnelle Erreichen eines aktuten Leberversagens könnte die Wirkung von Rottlerin bei post-Infektionsgabe nicht mehr ausreichen. Wie im post-operativen Ileus-Experiment könnte jedoch auch eine Änderung des Zeitpunkts der Applikation und eine andere Verabreichungsform, sowie die Konzentrationsänderung eine mögliche Verlängerung des Überlebens der Mäuse bewirken. Außerdem könnte der Stimulus durch die hohe Menge an AdGOL ($5x10^8$ PFU) zu stark sein, als dass Rottlerin einen Einfluss auf das Überleben der Mäuse hätte nehmen könnte. Es wäre also möglich, dass Rottlerin zwar die Anzahl aktivierter T-Zellen reduziert würde, dies aber nicht ausreichend wäre, um die Überlebensdauer signifikant zu verändern. Weiterhin findet das *„Cross-priming"* in diesem Experiment in der Leber statt, es wäre daher interessant zu sehen, ob dass von mir im *„in vivo kill"*-Experiment in der Milz untersuchte *„Cross-primining"* auch in anderen Organen (wie beispielsweise der Leber) durch Rottlerin inhibiert werden könnte.

Ein weiteres System, welches auf einer $CD4^+$-T-Zellantwort beruht, wird durch das nephrotoxische Schafserum ausgelöst und induziert eine nephrotoxische Nephritis. Die im Schafserum enthaltenen Schaf-Immunglobuline lagern sich spezifisch in der Nierenrinde ein. $CD4^+$-T-Zellen erkennen diese fremden Immunglobuline und produzieren pro-inflammatorische Zytokine, welche tubulointerstielle und glomeruläre Monozyten und Makrophagen aktivieren. Diese produzieren weitere Zytokine und reaktive Sauerstoff Spezies (ROS), welche die renalen Glomeruli schädigen und eine kompensatorische Proliferation des Epithels der glomerulären Basalmembran bewirken. Die Glomeruli dienen als Filter, womit nach der Schädigung die Filterfunktion der Niere abnimmt und somit vermehrt Proteine im Urin ausgeschieden werden (Assmann, Tangelder et al. 1985, Tipping and Holdsworth 2006). In meinem experimentellen Versuchsaufbau fand die Analyse dieser Nephritis-Parameter am 9. Tag durch Bestimmung der Proteinurie und mittels histomorphologischer Analyse der Niere statt. In diesem Experiment zeigte sich eine signifikante Steigerung der Nephritis-Parameter unter NTS (Proteinurie von 210 mg/dl und histomorphologische Veränderungen) und das Ausbleiben dieser Parameter bei der Kontrollgruppe (Proteinurie von 27,5 mg/dl und keine histomorphologische Veränderungen). Die Untersuchung von Applikationen im Zeitraum von Tag 1-8 könnte einen Idealzeitraum liefern, bei dem Rottlerin eine Wirkung zeigt. *In vitro* wurde zwar eine Wirkung auf $CD4^+$-OT-II-Zellen von

Majewski et al. nachgewiesen, jedoch ist die Erkenntnis ob und wie Rottlerin *in vivo* auf $CD4^+$-T-Zellen wirkt unklar. Daher müsste für das NTN-Experiment zunächst eine Untersuchung eines Basismodells erfolgen, welches sicher stellt, das $CD4^+$-T-Zellen von Rottlerin in ihrer Aktivität herunterreguliert werden, um abschätzen zu können, dass Rottlerin auch im NTN-Modell auf $CD4^+$-T-Zellen wirkt oder ob der protektive Effekt durch die Veränderungen anderer zellulärer Prozesse erfolgt. Mittels intravenöser LPS-Stimulation können $CD4^+$-T-Zellen über den MHC-II-Präsentationsweg aktiviert werden und nach Lymphknoten- und Milzextraktion aktiviert werden. Der Vergleich zwischen unbehandelten und mit Rottlerin-behandelten Mäusen könnte einen Effekt von Rottlerin auf die *in vivo* $CD4^+$-T-Zellaktivierung darstellen. Betrachtet man das Modell der Nephritis genauer lagern sich in der Peripherie gebildete Antigen-Antikörper-Komplexe in den glomerulären Kapillarschlingen ab. Dort induzieren diese eine Entzündungsreaktion, welche neben $CD4^+$-Lymphozyten auch Leukozyten anlockt und das Komplementsystem aktiviert. Eine Proliferation von Endothel und Mesangium führt zur Verdickung der Basalmembran und der Abnahme der renalen Filtrationsleistung. Rottlerin könnte daher durchaus auch eine Wirkung auf die Antikörper, die B-Zellen, die DC oder das Komplementsystem haben. Zum Nachweis eines Effekts auf die eben genannten lymphatischen Elemente könnten weitere Experimente durchgeführt werden, um eine eindeutige Wirkung von Rottlerin auf das entsprechende immunologische System zu identifizieren. Beispielsweise könnten B-Zellen zunächst *in vitro* mittels ODN2006 (TLR9-Agonist) stimuliert werden und 7 Tage deren Antikörperproduktion von IgG und IgM mittels ELISA („*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*“) gemessen werden (Van Belle, Herman et al. 2016). Eine Reduktion der Antikörperproduktion durch Rottlerin im Vergleich zur Kontrolle würde die inhibitorische Wirkung auf diesen Subtyp von Immunzellen bestätigen.

In einem abschließenden Experiment wurde ein Modell auf die diabetische Entwicklung bei RIP-mOVA-Mäusen getestet, welches in Zukunft auch für eine Anwendung von Rottlerin dienen könnte. Dabei wurde als Marker für die Entwicklung eines Diabetes die Glukosurie gemessen. Die Rottlerin-Gruppe zeigte eine signifikante Reduktion der Glukose im Urin im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zur Anlehnung an die meist im Kindesalter sich entwickelte Form des Diabetes Mellitus Typ 1, welche auf einer Zerstörung von ß-Zellen des Pankreas durch $CD8^+$-T-Zellen beruht, wurden in diesem *in vivo*-Modell $CD8^+$-OT-I-Zellen injiziert,

welche mit OVA-beladenen ß-Zellen, die in die in RIP-mOVA-Mäusen vorhanden sind, angreifen. Die Diabetes-Inzidenz für die Gruppe, die $CD8^+$-OT-I-Zellen erhielt, lag bei 100 %. Der zugrunde liegende Pathomechanismus könnte von Rottlerin moduliert werden, wobei nicht klar ist, ob Rottlerin nur auf $CD8^+$-OT-I-Zellen wirkt oder noch anders in die immunregulierenden Antworten eingreifen könnte. Bevor man diesen Aspekt jedoch klärt, müsste das Experiment noch erweitert werden, um sicher zu gehen, dass der Diabetes auch wirklich manifest ist. Die Messung der Diabetesinzidenz mittels der Urinteststreifen kann nur einen Hinweis auf das mögliche Vorliegen geben. Eine Testung mittels Blutglukosebestimmung mit zwei unabhängigen Messergebnissen von Glukose > 250 mg/dl würde einen sicheren Diabetes diagnostizieren (Drujont, Carretero-Iglesia et al. 2014). Das Blut könnte man über den submandibulären Plexus gewinnen (Regan, Fenyk-Melody et al. 2016). Des weiteren könnte man eine histomorphologische Analyse von pankreatischen Inseln während der diabetischen Genese durchführen, um eine weitere Bestätigung zu erhalten (Kanazawa, Komeda et al. 1984, Miyazaki, Hanafusa et al. 1985).
Um danach die Frage beantworten zu können, ob die OT-I-Zellen auch in diesem Krankheitsmodell von Rottlerin blockiert werden, könnte eine transgene $PKC^{-/-}$-OT-I-Maus generiert werden, welche im selben Experiment bei gleicher Wirkung wie bei Rottlerin auf mit normalen OT-I-Zellen infizierte RIP-mOVA-Mäuse hat, einerseits die Wirkung von Rottlerin auf $CD8^+$-OT-I-Zellen untermauern würde und andererseits auch die Rolle als Inhibitor der PKCδ-Signalkaskade unterstreichen würde.

5.4 Weiterer Ausblick und Kontroverse von Rottlerin

Diverse Arbeitsgruppen beschrieben für Rottlerin nicht nur einen Effekt auf die PKCδ, sondern auch auf andere PKC-Isoformen (López-Huertas, Mateos et al. 2011, Pabla, Dong et al. 2011). *Majewski et al.* beschrieb für die Mauslinie C57BI/6 das alleinige Vorkommen von der PKCδ-Isoform in BM-DC. Die von mir untersuchten *in vitro*-Vorgänge an BM-DC der selben Mauslinie legen daher nahe, dass Rottlerin über einen PKCδ-abhängigen Weg die BM-DC-Oberflächenmolekülexpression beeinträchtigt. *Gschwendt et al.* stellte zunächst einmal bei der Entdeckung von Rottlerin (Mallotoxin) als PKC-Inhibitor

heraus, dass das Mallotoxin bei bestimmten Konzentrationen selektiv die Proteinkinase C δ blockiert (Gschwendt, Müller et al. 1994). In den *in vitro*-Experimenten mit den BM-DC konnten durch das alleinige Vorhandensein der PKCδ auch höhere Konzentrationen genutzt werden, die sonst auch andere Proteinkinasen beeinflusst hätten.

5.4.1 Weitere Krankheitsmodelle

Die Daten aus meinen Experimenten lassen den Schluss zu, dass Rottlerin auch auf andere Krankheitsmodelle einen Einfluss haben könnte. Die rheumatoide Arthritis (RA) stellt dabei eine autoimmune Erkrankung dar bei welcher Gelenk-spezifische Antigene Ziele von arhritogenen T- oder B-Zellen werden (Kamradt and Schubert 2005). Ein murines Modell, welches genetisch unveränderte DBA/I-Mäuse als Basis nimmt, zeigt bei einer Immunisierung mit dem Enzym Glucose-6-Phophatisomerase (G6PI) ein häufiges Auftreten einer symmetrischen peripheren Polyarthritis ähnlich einer rheumatoiden Arthritis. $CD4^+$-T-Zellen sind dabei notwendig für die Induktion als auch für die Effektorphase der Arthritis (Kamradt and Schubert 2005). In meinem *in vivo*-Experiment der NTN, welches auch $CD4^+$-T-Zellabhängig ist und dessen Krankheitsverlauf durch Rottlerin gemildert werden könnte, wäre auch in dem $CD4^+$-T-Zellabhängigen Modell der RA für Rottlerin ein abschwächender Effekt möglich.

Ein anderes Krankheitsmodell, welches durch autoreaktive T-Zellen gegen Haut-assoziierte Antigene entsteht, ist die Psoriasis. Eine Arbeitsgruppe um *Min et al.* nutzte ein IPI (Imiquimod-induzierte psoriasiforme Entzündung)-Modell, welches T-Zell-abhängig eine entzündliche Hauterkrankung auslöst, die etliche Ähnlichkeiten mit der Psoriasis hat (Min, Yan et al. 2017) Dabei konnte festgestellt werden, dass Rottlerin die psoriasiforme Entzündung in BALB/c-Mäusen abschwächen konnte. Dazu trugen die Blockade der Keratozytenproliferation, der inflammatorischen Zellinfiltration und der vaskulären Proliferation bei. Außerdem konnte gezeigt werden, dass humane epidermale Kertatinozyten (NHEKs) *in vitro* mittels Rottlerin an der Zellproliferation gehindert worden (Min, Yan et al. 2017).

Da die Psoriasis hauptsächlich durch T_H17-Zellen gesteuert wird, könnte die Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ein weiteres *in vivo*-Modell

zur Untersuchung der entsprechenden Effekte von Rottlerin darstellen. Die Entzündung des Gehirns und die Paralyse wird auch durch T_H1- und T_H17-Zellen, welche spezifisch für das Myelinbasisprotein (MBP) sind, vermittelt (O'Connor, Prendergast et al. 2008).

5.4.2 Humane Versuche

Es konnte zwar eine Wirkung von Rottlerin auf murine Zellen nachgewiesen werden, jedoch müsste unter dem therapeutischen Aspekt auch die Spannbreite von Einsatzmöglichkeiten in humanen Zelllinien untersucht werden. *Lopez-Huertas et al.* untersuchte die Wirkung von Rottlerin auf die Infektion von humanen Jurkat- und MT2-Zelllinien mit HIV („*Human Immunodeficiency Virus*“) (López-Huertas, Mateos et al. 2011). Es zeigte sich in diesem Falle eine Reduktion der HIV-Replikation in den immortalisierten T-Zellen, basierend auf einer Inhibition der PKCθ. In bestimmten humanen Zellen könnte daher eine andere PKC-Isoform als in murinen Zellen gehemmt werden, jedoch könnte der daraus resultierende Effekt derselbe sein. Bei einem entsprechenden Erfolg auf humaner zellulärer Ebene würde als nächster Schritt eine Übertragung auf humane klinische Studien erfolgen. Für die richtige Wirkungsart könnte man von den Ergebnissen aus den murinen *in vivo* Experimenten profitieren, wenn man weiß, welche Form der Applikation zu wählen ist. *Min et al.* wählte die orale Applikationsform mittels Sondenernährung und konnte damit in dem vorher beschriebenen IPI-Modell inhibitorische Effekte von Rottlerin nachweisen (Min, Yan et al. 2017). Da eine enterale Sondenernährung beim Menschen in der Praxis eher selten vorkommt, müssten eine orale Gabe in Pulver-, Tabletten, oder Flüssigform auf deren Effizienz überprüft werden.

5.4.3 Rottlerin als Immunsuppressivum bei einer Transplantation

Allogene Organtransplantationen lösen automatisch eine Immunantwort gegen das Allotransplantat aus und verursachen im schlimmsten Fall eine Abstoßungsreaktion. Um einer solchen Abstoßungsreaktion vorzubeugen, wird eine medikamentöse Immunsuppression eingeleitet. Als Basismedikament dienen dabei in den meisten Fällen Corticosteroide. Diese werden *intravenös* in hohen Dosen

verabreicht während der Transplantoperation und in den ersten postoperativen Tagen (gewöhnlich bis zu 3 Tage) in Kombination mit wenigstens einem anderem Immunsuppressivum (Bush 1999, Liu, Fan et al. 2004, Moini, Schilsky et al. 2015). Jedes Immunsuppressivum bringt eine Vielzahl an möglichen Nebenwirkungen mit sich wie eine Erhöhung des Infektionsrisikos, das Cushing-Syndrom, Hypertension oder Magen-Darm-Beschwerden.
Zur Aufrechterhaltung der Immunsuppression und zur Senkung der Steroidmenge werden Calcineurinhemmer wie Ciclosporin verwendet. Diese haben jedoch wie Corticosteroide erhebliche Nebenwirkungen (Bush 1999). Für die additive Nutzung von Antikörpern, welche speziell für die Inhibition oder Depletion von Empfänger-T-Zellen entwickelt worden, wurde ebenfalls eine Reduktion von akuten Abstoßungsepisoden im Leberallotransplantat beschrieben (Moini, Schilsky et al. 2015). Die Antikörper ermöglichen zudem die Konzentrationen von anderen Immunsuppressiva zu senken, somit auch deren potentielle Nebenwirkungen auf ein Minimum zu reduzieren und weniger eigene Nebenwirkungen auszulösen.
Rottlerin als möglicher T-Zellinhibitor könnte auch bei einer Transplantation eingesetzt werden. Dabei könnte in einem möglichen Transplantationsexperiment, wahlweise mit der Leber oder Niere getestet werden, ob Rottlerin alleine oder nur als Adjuvanz zur Standardtherapie bei Transplanationen von allogenen Organen eine Wirkung hätte (Yokota, Ueki et al. 2016).

5.4.4 *In vitro* und *in vivo* Spezifität von Rottlerin auf die Proteinkinase C δ

Es konnte zwar *in vitro* bezogen auf die Daten von *Majewski et al.* gezeigt werden, dass Rottlerin über die Blockade von PKCδ wirken könnte, jedoch müsste auch eine Analyse der Proteinkinasen in den OT-I-Zellen erfolgen. In beiden Fällen würde sich ein mRNA-Gen-„*silencing*“ anbieten. Dazu würden die kultivierten Zellen mit einer synthetischen siRNA transfiziert werden, welche spezifisch das PKCδ-Gen eliminieren würde. Die *in vitro*-Experimente könnten unter diesen Bedingungen wiederholt werden und mit den Resultaten unter Rottlerin-Einwirkung verglichen werden. Bei Gleichheit würde das PKCδ-„*silencing*“ beweisen, dass Rottlerin die PKCδ inhibiert (Sliva and Schnierle 2010). Einen Anhaltspunkt für die Annahme, dass Rottlerin die CTL-Aktivierung über Inhibition der PKCδ unterdrücken könnte,

liefert *Pardo et al.* Die Arbeitsgruppe zeigte, dass die PKC-Isoform-Aktivierung für die CTL-Degranulation und TZR-induzierte Fas-Ligandenexpression verantwortlich ist (Pardo, Buferne et al. 2003).

Die Frage, ob Rottlerin auch *in vivo* über die Inhibition von PKCδ wirkt, müsste anhand von transgenen Mäusen beantwortet werden, welche über ein „*cre-loxP*"-vermitteltes Rekombinationssystem verfügen. Um solche transgenen Mäuse zu züchten, müsste eine Maus mit dem Gen der „*cre*"-Rekombinase ausgestattet werden und eine andere Maus mit zwei „*loxP*"-Sequenzen vor und hinter dem Gen der PKCδ speziell in DC oder T-Zellen kreiert werden (McLellan, Rosenthal et al. 2017). Nach Aufzucht beider Mauslinien werden diese gekreuzt. Leider könnte der Ausfall des PKCδ-Proteins während der Embryonalentwicklung zu fatalen Schäden führen, so dass die „*cre*"-Rekombinase zusätzlich mit einer Ligandenbindungsdomäne (LBD) eines Östrogenrezeptors fusioniert wird. Die LBD bindet nur synthetisches Antiöstrogen (Tamoxifen). Erst nach Gabe von Tamoxifen kann die fusionierte „*cre*"-Rekombinase vom Zytosol der Zelle in den Zellkern gelangen und dort das „*loxP*"-flankierte Gen der PKCδ auschneiden und final ausschalten (McLellan, Rosenthal et al. 2017). Mit Hilfe dieses System könnten nun die *in vivo*-Experimente wiederholt werden und bei gleichen Ergebnissen wie bei einer möglichen Anwendung von Rottlerin einen Nachweis bringen, dass Rottlerin *in vivo* über die Inhibition von PKCδ fungiert.

6. Zusammenfassung

Beobachtungen von *Majewski et al.* zeigten, dass Rottlerin einen Effekt auf die klassische Antigenpräsentation von BM-DC zu OT-II-Zellen hat. Basierend auf diesen Erkenntnissen fand ich zufällig heraus, dass Rottlerin auch einen Effekt auf die *in vitro* Kreuzpräsentation von BM-DC zu OT-I-Zellen hat. Resümierend stellen meine Ergebnisse *in vitro* mit den von *Majewski et al.* heraus, an welchen Stellen Rottlerin auf die MHC-I- als auch MHC-II-vermittelte Peptidpräsentation wirkt. Außerdem konnte ich die Fragen beantworten, welche *Majweksi et al.* offen gelassen hatte. Einerseits konnte ich belegen, dass Rottlerin die Hochregulation kostimulatorischer Moleküle inhibiert als auch einen direkten Einfluss auf die T-Zellaktivierung hat.

In dieser Arbeit ist es zudem gelungen, mögliche *in vivo* Versuche auf eine zukünftige Anwendung von Rottlerin zu etablieren und um in späteren Arbeiten zu überprüfen, ob Rottlerin auch dort die $CD8^+$-T-Zell-Aktivierung indirekt oder direkt inhibiert. Mit diesen Erkenntnissen für $CD8^+$-OT-I-Zellen und den *in vitro*-Ergebnissen von *Majewski et al.* über die eingeschränkte $CD4^+$-T-Zellaktivierung legten die Überprüfung der Funktionalität von diversen *in vivo*-Krankheitsmodellen die auf diesen T-Zelltypen basieren nahe. In den angelehnten Krankheitsmodellen des POI, des AdGOL-induzierten Leberversagens, der NTN und des T1D könnte Rottlerin signifikante Reduktionen der Krankheitsparameter in der Entwicklung des jeweiligen Krankheitsbildes bewirken. Mit einer weiterführenden Modulation der Administrationsdauer, -art und -frequenz könnte durchaus auch in anderen Krankheitsmodellen ein Erfolg eingestellt werden.

Zuletzt könnte mithilfe von „*gefloxten*“ Mäusen, überprüft werden, ob sich die für Rottlerin beschriebenen *in vivo*-Effekte nur oder teilweise über eine Inhibition der PKCδ darstellen.

In der Zukunft könnte somit einerseits der zugrunde liegende Mechanismus von Rottlerin auf Immunprozesse und andererseits die Wirkung von Rottlerin auf weitere Krankheitsmodelle untersucht werden. Die Untersuchungen sind zwar noch nicht vollständig, jedoch könnte die potentielle immunmodulatorische Wirkung von Rottlerin weiterentwickelt werden, um dieses als zukünftiges Therapeutikum nutzbar zu machen.

7. Literaturverzeichnis

Albert, M. L., B. Sauter and N. Bhardwaj (1998). "Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs." Nature **392**(6671): 86-89.

Amarante-Mendes, G. P., S. Adjemian, L. M. Branco, L. C. Zanetti, R. Weinlich and K. R. Bortoluci (2018). "Pattern Recognition Receptors and the Host Cell Death Molecular Machinery." Front Immunol **9**: 2379.

Assan, R., G. Feutren, M. Debray-Sachs, M. C. Quiniou-Debrie, C. Laborie, G. Thomas, L. Chatenoud and J. F. Bach (1985). "Metabolic and immunological effects of cyclosporin in recently diagnosed type 1 diabetes mellitus." Lancet **1**(8420): 67-71.

Assmann, K. J., M. M. Tangelder, W. P. Lange, G. Schrijver and R. A. Koene (1985). "Anti-GBM nephritis in the mouse: severe proteinuria in the heterologous phase." Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol **406**(3): 285-299.

Atkinson, M. A. (2012). "The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(11).

Atkinson, M. A., M. A. Bowman, L. Campbell, B. L. Darrow, D. L. Kaufman and N. K. Maclaren (1994). "Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and coxsackie virus in insulin-dependent diabetes." J Clin Invest **94**(5): 2125-2129.

Atkinson, M. A. and N. K. Maclaren (1990). "What causes diabetes?" Sci Am **263**(1): 62-63, 66-71.

Bach, J. F. (1987). "Cyclosporine in insulin-dependent diabetes mellitus." J Pediatr **111**(6 Pt 2): 1073-1074.

Bevan, M. J. (1976). "Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay." J Exp Med **143**(5): 1283-1288.

Beyersdorf, N., T. Kerkau and T. Hünig (2015). "CD28 co-stimulation in T-cell homeostasis: a recent perspective." Immunotargets Ther **4**: 111-122.

Bush, W. W. (1999). "Overview of transplantation immunology and the pharmacotherapy of adult solid organ transplant recipients: focus on immunosuppression." AACN Clin Issues **10**(2): 253-269; quiz 304-256.

Chaplin, D. D. (2010). "Overview of the immune response." J Allergy Clin Immunol **125**(2 Suppl 2): S3-23.

Conrad, B., E. Weidmann, G. Trucco, W. A. Rudert, R. Behboo, C. Ricordi, H. Rodriquez-Rilo, D. Finegold and M. Trucco (1994). "Evidence for superantigen involvement in insulin-dependent diabetes mellitus aetiology." Nature **371**(6495): 351-355.

de Abreu Costa, L., M. Henrique Fernandes Ottoni, M. G. Dos Santos, A. B. Meireles, V. Gomes de Almeida, W. de Fátima Pereira, B. Alves de Avelar-Freitas and G. Eustáquio Alvim Brito-Melo (2017). "Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Decreases Cell Proliferation and TNF-α, IFN-γ, and IL-2 Cytokines Production in Cultures of Peripheral Blood Lymphocytes." Molecules **22**(11).

Delovitch, T. L. and B. Singh (1997). "The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD." Immunity **7**(6): 727-738.

Drujont, L., L. Carretero-Iglesia, L. Bouchet-Delbos, G. Beriou, E. Merieau, M. Hill, Y. Delneste, M. C. Cuturi and C. Louvet (2014). "Evaluation of the therapeutic potential of bone marrow-derived myeloid suppressor cell (MDSC) adoptive transfer in mouse models of autoimmunity and allograft rejection." PLoS One **9**(6): e100013.

Engel, D. R., A. Koscielny, S. Wehner, J. Maurer, M. Schiwon, L. Franken, B. Schumak, A. Limmer, T. Sparwasser, A. Hirner, P. A. Knolle, J. C. Kalff and C. Kurts (2010). "T helper type 1 memory cells disseminate postoperative ileus over the entire intestinal tract." Nat Med **16**(12): 1407-1413.

Falcone, M., B. Yeung, L. Tucker, E. Rodriguez and N. Sarvetnick (1999). "A defect in interleukin 12-induced activation and interferon gamma secretion of peripheral natural killer T cells in nonobese diabetic mice suggests new pathogenic mechanisms for insulin-dependent diabetes mellitus." J Exp Med **190**(7): 963-972.

Garyu, J. W., E. Meffre, C. Cotsapas and K. C. Herold (2016). "Progress and challenges for treating Type 1 diabetes." J Autoimmun **71**: 1-9.

Gill, R. G., P. P. Pagni, T. Kupfer, C. H. Wasserfall, S. Deng, A. Posgai, Y. Manenkova, A. Bel Hani, L. Straub, P. Bernstein, M. A. Atkinson, K. C. Herold, M. von Herrath, T. Staeva, M. R. Ehlers and G. T. Nepom (2016). "A Preclinical Consortium Approach for Assessing the Efficacy of Combined Anti-CD3 Plus IL-1 Blockade in Reversing New-Onset Autoimmune Diabetes in NOD Mice." Diabetes **65**(5): 1310-1316.

Graham, K. L., N. Sanders, Y. Tan, J. Allison, T. W. Kay and B. S. Coulson (2008). "Rotavirus infection accelerates type 1 diabetes in mice with established insulitis." J Virol **82**(13): 6139-6149.

Graham, K. L., R. M. Sutherland, S. I. Mannering, Y. Zhao, J. Chee, B. Krishnamurthy, H. E. Thomas, A. M. Lew and T. W. Kay (2012). "Pathogenic mechanisms in type 1 diabetes: the islet is both target and driver of disease." Rev Diabet Stud **9**(4): 148-168.

Griffiths, M. M., J. A. Encinas, E. F. Remmers, V. K. Kuchroo and R. L. Wilder (1999). "Mapping autoimmunity genes." Curr Opin Immunol **11**(6): 689-700.

Gruessner, R. W. and A. C. Gruessner (2013). "Pancreas transplant alone: a procedure coming of age." Diabetes Care **36**(8): 2440-2447.

Gschwendt, M., H. J. Müller, K. Kielbassa, R. Zang, W. Kittstein, G. Rincke and F. Marks (1994). "Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor." Biochem Biophys Res Commun **199**(1): 93-98.

Hamel, Y., F. X. Mauvais, H. P. Pham, R. Kratzer, C. Marchi, É. Barilleau, E. Waeckel-Enée, J. B. Arnoux, A. Hartemann, C. Cordier, J. Mégret, B. Rocha, P. de Lonlay, J. Beltrand, A. Six, J. J. Robert and P. van Endert (2016). "A unique CD8(+) T lymphocyte signature in pediatric type 1 diabetes." J Autoimmun **73**: 54-63.

Heymann, F., C. Meyer-Schwesinger, E. E. Hamilton-Williams, L. Hammerich, U. Panzer, S. Kaden, S. E. Quaggin, J. Floege, H. J. Gröne and C. Kurts (2009). "Kidney dendritic cell activation is required for progression of renal disease in a mouse model of glomerular injury." J Clin Invest **119**(5): 1286-1297.

Horwitz, M. S., L. M. Bradley, J. Harbertson, T. Krahl, J. Lee and N. Sarvetnick (1998). "Diabetes induced by Coxsackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry." Nat Med **4**(7): 781-785.

Joffre, O. P., E. Segura, A. Savina and S. Amigorena (2012). "Cross-presentation by dendritic cells." Nat Rev Immunol **12**(8): 557-569.

Kamradt, T. and D. Schubert (2005). "The role and clinical implications of G6PI in experimental models of rheumatoid arthritis." Arthritis Res Ther **7**(1): 20-28.

Kanazawa, Y., K. Komeda, S. Sato, S. Mori, K. Akanuma and F. Takaku (1984). "Non-obese-diabetic mice: immune mechanisms of pancreatic beta-cell destruction." Diabetologia **27 Suppl**: 113-115.

Keymeulen, B., M. Walter, C. Mathieu, L. Kaufman, F. Gorus, R. Hilbrands, E. Vandemeulebroucke, U. Van de Velde, L. Crenier, C. De Block, S. Candon, H. Waldmann, A. G. Ziegler, L. Chatenoud and D. Pipeleers (2010). "Four-year metabolic outcome of a randomised controlled CD3-antibody trial in recent-onset type 1 diabetic patients depends on their age and baseline residual beta cell mass." Diabetologia **53**(4): 614-623.

Koscielny, A., D. Engel, J. Maurer, S. Wehner, C. Kurts and J. C. Kalff (2013). "The role of lymphoid tissue in the attenuation of the postoperative ileus." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **304**(4): G401-412.

Krishnan, R., M. Alexander, L. Robles, C. E. Foster and J. R. Lakey (2014). "Islet and stem cell encapsulation for clinical transplantation." Rev Diabet Stud **11**(1): 84-101.

Krummel, M. F., F. Bartumeus and A. Gérard (2016). "T cell migration, search strategies and mechanisms." Nat Rev Immunol **16**(3): 193-201.

Kurts, C., F. R. Carbone, M. Barnden, E. Blanas, J. Allison, W. R. Heath and J. F. Miller (1997). "CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity." J Exp Med **186**(12): 2057-2062.

Kurts, C., B. W. Robinson and P. A. Knolle (2010). "Cross-priming in health and disease." Nat Rev Immunol **10**(6): 403-414.

L, Y. (2013). Recognition of self and altered self by T cells in autoimmunity and allergy.

Lee, N. R., B. S. Park, S. Y. Kim, A. Gu, D. H. Kim, J. S. Lee and I. S. Kim (2016). "Cytokine secreted by S100A9 via TLR4 in monocytes delays neutrophil apoptosis by inhibition of caspase 9/3 pathway." Cytokine **86**: 53-63.

Lehmann, P. V., T. Forsthuber, A. Miller and E. E. Sercarz (1992). "Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen." Nature **358**(6382): 155-157.

Liu, C. L., S. T. Fan, C. M. Lo, S. C. Chan, I. O. Ng, C. L. Lai and J. Wong (2004). "Interleukin-2 receptor antibody (basiliximab) for immunosuppressive induction therapy after liver transplantation: a protocol with early elimination of steroids and reduction of tacrolimus dosage." Liver Transpl **10**(6): 728-733.

López-Huertas, M. R., E. Mateos, G. Díaz-Gil, F. Gómez-Esquer, M. Sánchez del Cojo, J. Alcamí and M. Coiras (2011). "Protein kinase Ctheta is a specific target for inhibition of the HIV type 1 replication in CD4+ T lymphocytes." J Biol Chem **286**(31): 27363-27377.

Mackay, I. R. (2000). "Science, medicine, and the future: Tolerance and autoimmunity." BMJ **321**(7253): 93-96.

Majewski, M., T. O. Bose, F. C. Sillé, A. M. Pollington, E. Fiebiger and M. Boes (2007). "Protein kinase C delta stimulates antigen presentation by Class II MHC in murine dendritic cells." Int Immunol **19**(6): 719-732.

McAleer, J. P. and A. T. Vella (2008). "Understanding how lipopolysaccharide impacts CD4 T-cell immunity." Crit Rev Immunol **28**(4): 281-299.

McLellan, M. A., N. A. Rosenthal and A. R. Pinto (2017). "Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations." Curr Protoc Mouse Biol **7**(1): 1-12.

Min, M., B. X. Yan, P. Wang, L. Landeck, J. Q. Chen, W. Li, S. Q. Cai, M. Zheng and X. Y. Man (2017). "Rottlerin as a therapeutic approach in psoriasis: Evidence from in vitro and in vivo studies." PLoS One **12**(12): e0190051.

Miyazaki, A., T. Hanafusa, K. Yamada, J. Miyagawa, H. Fujino-Kurihara, H. Nakajima, K. Nonaka and S. Tarui (1985). "Predominance of T lymphocytes in pancreatic islets and spleen of pre-diabetic non-obese diabetic (NOD) mice: a longitudinal study." Clin Exp Immunol **60**(3): 622-630.

Moini, M., M. L. Schilsky and E. M. Tichy (2015). "Review on immunosuppression in liver transplantation." World J Hepatol **7**(10): 1355-1368.

Morran, M. P., G. S. Omenn and M. Pietropaolo (2008). "Immunology and genetics of type 1 diabetes." Mt Sinai J Med **75**(4): 314-327.

Muhammad, S. (2014). "Nephrotoxic nephritis and glomerulonephritis: animal model versus human disease." Br J Biomed Sci **71**(4): 168-171.

Müller, S. A., N. N. Rahbari, F. Schneider, R. Warschkow, T. Simon, M. von Frankenberg, U. Bork, J. Weitz, B. M. Schmied and M. W. Büchler (2012). "Randomized clinical trial on the effect of coffee on postoperative ileus following elective colectomy." Br J Surg **99**(11): 1530-1538.

Nicholson, L. B. (2016). "The immune system." Essays Biochem **60**(3): 275-301.

O'Connor, R. A., C. T. Prendergast, C. A. Sabatos, C. W. Lau, M. D. Leech, D. C. Wraith and S. M. Anderton (2008). "Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **181**(6): 3750-3754.

Ohashi, P. S. (2002). "T-cell signalling and autoimmunity: molecular mechanisms of disease." Nat Rev Immunol **2**(6): 427-438.

Oldstone, M. B. (1998). "Molecular mimicry and immune-mediated diseases." FASEB J **12**(13): 1255-1265.

Orban, T., B. Bundy, D. J. Becker, L. A. Dimeglio, S. E. Gitelman, R. Goland, P. A. Gottlieb, C. J. Greenbaum, J. B. Marks, R. Monzavi, A. Moran, M. Peakman, P. Raskin, W. E. Russell, D. Schatz, D. K. Wherrett, D. M. Wilson, J. P. Krischer, J. S.

Skyler and T. D. T. A. S. Group (2014). "Costimulation modulation with abatacept in patients with recent-onset type 1 diabetes: follow-up 1 year after cessation of treatment." Diabetes Care **37**(4): 1069-1075.

Ozbay Hoşnut, F., O. Canan, F. Ozçay and B. Bilezikçi (2008). "Adenovirus infection as possible cause of acute liver failure in a healthy child: a case report." Turk J Gastroenterol **19**(4): 281-283.

Pabla, N., G. Dong, M. Jiang, S. Huang, M. V. Kumar, R. O. Messing and Z. Dong (2011). "Inhibition of PKCδ reduces cisplatin-induced nephrotoxicity without blocking chemotherapeutic efficacy in mouse models of cancer." J Clin Invest **121**(7): 2709-2722.

Pardo, J., M. Buferne, M. J. Martínez-Lorenzo, J. Naval, A. M. Schmitt-Verhulst, C. Boyer and A. Anel (2003). "Differential implication of protein kinase C isoforms in cytotoxic T lymphocyte degranulation and TCR-induced Fas ligand expression." Int Immunol **15**(12): 1441-1450.

Pescovitz, M. D., C. J. Greenbaum, B. Bundy, D. J. Becker, S. E. Gitelman, R. Goland, P. A. Gottlieb, J. B. Marks, A. Moran, P. Raskin, H. Rodriguez, D. A. Schatz, D. K. Wherrett, D. M. Wilson, J. P. Krischer, J. S. Skyler and T. D. T. A.-C. S. Group (2014). "B-lymphocyte depletion with rituximab and β-cell function: two-year results." Diabetes Care **37**(2): 453-459.

Regan, R. D., J. E. Fenyk-Melody, S. M. Tran, G. Chen and K. L. Stocking (2016). "Comparison of Submental Blood Collection with the Retroorbital and Submandibular Methods in Mice (Mus musculus)." J Am Assoc Lab Anim Sci **55**(5): 570-576.

Rose, N. R. and I. R. Mackay (2000). "Molecular mimicry: a critical look at exemplary instances in human diseases." Cell Mol Life Sci **57**(4): 542-551.

Ryan, E. A., B. W. Paty, P. A. Senior, D. Bigam, E. Alfadhli, N. M. Kneteman, J. R. Lakey and A. M. Shapiro (2005). "Five-year follow-up after clinical islet transplantation." Diabetes **54**(7): 2060-2069.

Scherer, M. T., L. Ignatowicz, G. M. Winslow, J. W. Kappler and P. Marrack (1993). "Superantigens: bacterial and viral proteins that manipulate the immune system." Annu Rev Cell Biol **9**: 101-128.

Shoda, L. K., D. L. Young, S. Ramanujan, C. C. Whiting, M. A. Atkinson, J. A. Bluestone, G. S. Eisenbarth, D. Mathis, A. A. Rossini, S. E. Campbell, R. Kahn and H. T. Kreuwel (2005). "A comprehensive review of interventions in the NOD mouse and implications for translation." Immunity **23**(2): 115-126.

Silverstein, J., N. Maclaren, W. Riley, R. Spillar, D. Radjenovic and S. Johnson (1988). "Immunosuppression with azathioprine and prednisone in recent-onset insulin-dependent diabetes mellitus." N Engl J Med **319**(10): 599-604.

Sliva, K. and B. S. Schnierle (2010). "Selective gene silencing by viral delivery of short hairpin RNA." Virol J **7**: 248.

Sperandio, B., N. Fischer and P. J. Sansonetti (2015). "Mucosal physical and chemical innate barriers: Lessons from microbial evasion strategies." Semin Immunol **27**(2): 111-118.

Timoshanko, J. R., A. R. Kitching, S. R. Holdsworth and P. G. Tipping (2001). "Interleukin-12 from intrinsic cells is an effector of renal injury in crescentic glomerulonephritis." J Am Soc Nephrol **12**(3): 464-471.

Tipping, P. G. and S. R. Holdsworth (2006). "T cells in crescentic glomerulonephritis." J Am Soc Nephrol **17**(5): 1253-1263.

Turvey, S. E. and D. H. Broide (2010). "Innate immunity." J Allergy Clin Immunol **125**(2 Suppl 2): S24-32.

Van Belle, K., J. Herman, L. Boon, M. Waer, B. Sprangers and T. Louat (2016). "Comparative In Vitro Immune Stimulation Analysis of Primary Human B Cells and B Cell Lines." J Immunol Res **2016**: 5281823.

Vilz, T. O., M. Overhaus, B. Stoffels, M. Websky, J. C. Kalff and S. Wehner (2012). "Functional assessment of intestinal motility and gut wall inflammation in rodents: analyses in a standardized model of intestinal manipulation." J Vis Exp(67).

von Boehmer, H., H. S. Teh and P. Kisielow (1989). "The thymus selects the useful, neglects the useless and destroys the harmful." Immunol Today **10**(2): 57-61.

Vyse, T. J., B. J. Morley, I. Bartok, E. L. Theodoridis, K. A. Davies, A. D. Webster and M. J. Walport (1996). "The molecular basis of hereditary complement factor I deficiency." J Clin Invest **97**(4): 925-933.

Walter, J. E., J. R. Farmer, Z. Foldvari, T. R. Torgerson and M. A. Cooper (2016). "Mechanism-Based Strategies for the Management of Autoimmunity and Immune Dysregulation in Primary Immunodeficiencies." J Allergy Clin Immunol Pract **4**(6): 1089-1100.

Wang, Z., Z. Xie, Q. Lu, C. Chang and Z. Zhou (2017). "Beyond Genetics: What Causes Type 1 Diabetes." Clin Rev Allergy Immunol **52**(2): 273-286.

Welz, M., S. Eickhoff, Z. Abdullah, J. Trebicka, K. H. Gartlan, J. A. Spicer, A. J. Demetris, H. Akhlaghi, M. Anton, K. Manske, D. Zehn, B. Nieswandt, C. Kurts, J. A. Trapani, P. Knolle, D. Wohlleber and W. Kastenmüller (2018). "Perforin inhibition protects from lethal endothelial damage during fulminant viral hepatitis." Nat Commun **9**(1): 4805.

Whitton, J. L. and R. S. Fujinami (1999). "Viruses as triggers of autoimmunity: facts and fantasies." Curr Opin Microbiol **2**(4): 392-397.

Wooldridge, L., J. Ekeruche-Makinde, H. A. van den Berg, A. Skowera, J. J. Miles, M. P. Tan, G. Dolton, M. Clement, S. Llewellyn-Lacey, D. A. Price, M. Peakman and A. K. Sewell (2012). "A single autoimmune T cell receptor recognizes more than a million different peptides." J Biol Chem **287**(2): 1168-1177.

Yokota, S., S. Ueki, Y. Ono, N. Kasahara, A. Pérez-Gutiérrez, S. Kimura, O. Yoshida, N. Murase, Y. Yasuda, D. A. Geller and A. W. Thomson (2016). "Orthotopic mouse liver transplantation to study liver biology and allograft tolerance." Nat Protoc **11**(7): 1163-1174.

8. Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
1.1	Übersicht der Zellen des innaten und adaptiven Immunsystems	3
1.2	Antigenpräsentationswege	5
1.3	CTL-Programmierung und DC-Lizenzierung	8
1.4	Elimination von Zielzellen durch eine zytotoxische T-Zelle	10
1.5	T-Zellsignalkaskade und Autoimmunität	12
1.6	Aufbau und Fehlfunktion von Toleranz	13
4.1	Der Einfluss von Rottlerin auf die OVA-Aufnahme und –prozessierung in BM-DC *in vitro*	37
4.2	Rottlerin inhibiert die T-Zellaktivierung *in vitro*	39
4.3	Rottlerin inhibiert die Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen *in vitro*	41
4.4	Rottlerin blockiert direkt die T-Zellaktivierung und hat zudem einen negativen Effekt bei der BM-DC vermittelten T-Zellaktivierung i*n vitro*	44
4.5	Modellierung der OVA-spezifischen Zytotoxizität und der Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen *in vivo*	46
4.6	Modellierung eines post-operativen Ileus	48
4.7	Induktion eines akuten Leberversagens bei OT-I-Mäusen mittels Adenovirus	49
4.8	Induktion einer nephrotoxischen Nephritis mittels NTS	51
4.9	Diabetische Entwicklung in RIP-mOVA-Mäusen nach Injektion von OT-I-Zellen	52

8.2 Abbkürzungverzeichnis

Abkürzung	**Bedeutung**
Alexa647	AlexaFluor647
APC	Antigen-Präsentierende Zelle
ATG	anti-Thymozytenglobulin
BSA	„Bovine serum albumin“
BM-DC	Knochenmark-Dendritische Zelle (engl. „Bone-marrow derived DC“)
CCL	Chemokine
CD	engl. „Cluster of Differentiation“
CCL	Chemokin
CCR	Chemokin-Rezeptor
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidylester
CpG	Cytosin-Guanin Oligonukleotid
CTL	engl. „Cytotoxic T-cell“
CTLA	engl. „Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein“
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindol
DC	engl. „Dendritc cell“
DMA	Dimethylacetamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. "Desoxyribonucleic acid"
dNTPs	Desoxynucleosid-Triphosphate
DT	Diphtherietoxin
DTR	Diphtherietoxin-Rezeptor
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEA	engl. „Early endosome marker“
ELISA	engl. „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“
FACS	engl. „Fluorescence activated cell

	sorting“
FCS	engl. „Fetal calf serum“
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	engl. „Forward scatter“
G6PI	Glucose-6-Phophatisomerase
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GM-CSF	engl. "Granulocyte macrophage colony-stimulating factor"
h	engl. „Hour“
HIV	engl. „Human Immunodeficiency Virus“
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-R	Interleukin-Rezeptor
IMDM	engl. "Iscove's Modified Dulbecco's Medium"
IPI	Imiquimod-induzierte psoriasiforme Entzündung
i.v.	Intravenös
LAMP	engl. „Lysosomal-associated membrane protein“
LDB	Ligandenbindungsdomäne
LPS	Lipopolysaccarid
MACS	engl. „Magnetic activated cell sorting“
MBP	Myelinbasisprotein
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MS	Multiple Sklerose
MHC	engl. „Major Histocompatibilty Complex“
NF-AT	engl. „Nuclear factor of activated T-cells“
NHEK	Humane epidermale Keratinozyten
NOD	engl. „Non-Obese Diabetic“

NTN	Nephrotoxische Nephritis
NTS	Nephrotoxisches Schafserum
NZB	engl. „New Zealand Black“
OT-I	Ovalbumin-spezischer T-Zell Rezeptor transgene $CD8^+$-T-Zelle
OVA	Ovalbumin
PAMP	engl. „Pathogen-associated molecular pattern“
PAS	Periodsäure-Schiffs-Reagenz
PB	engl. „Pacific blue“
PBS	engl. „Phosphate-buffered saline“
p.c.	Percutan
RCB-Puffer	engl. „Red Blood Cell“ - Puffer
PDL	engl. „Programmed death ligand“
PE	Phycoerythrin
PERM	Permeabilisationspuffer
PFA	Paraformaldehyd
PFU	engl. „Plaque forming unit“
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
p.o.	lat. „Per os“
POI	Post-operativer Ileus
PRR	engl. „Pathogen recognition receptor“
RA	Rheumatoide Arthritis
RIP	engl. „Rat insulin promoter“
ROS	engl. „Reactive oxygen species“
SIINFEKL	Ovalbumin Peptid 257-264
SSC	engl. „Side scatter“
TAP	engl. „Transporter associated with antigen processing“
TCR	engl. „T-cell receptor“
TEMED	Tetramethylethylendiamin

TGF	engl. „Tumor growth factor“
TLR	engl. „Toll-like receptor“
TNF	Tumornekrosefaktor
TZR	T-Zellrezeptor
T_H	T-Helferzelle
T1D	engl. „Type 1 Diabetes“

8.3 Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen

Meine Lehrenden in Marburg waren:

Adamkiewicz, Bartsch, Bauer, Baum, Baumann, Becker, Berger, Bette, Bösner, Brehm, Burchert, Cetin, Czubayko, Daut, Del Rey, Donner-Banzhoff, Fendrich, Feuser, Görg, Gress, Hadji, Hertl, Höffken, Hofmann, Holst, Hoyer, Hundt, Jacobsohn, Jerrentrup, Kann, Kill, Kinscherf, Kircher, Klose, Koolman, Köhler, König, Lill, Lohoff, Mahnken, Maier, Maisch, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Nimsky, Oertel, Olbert, Pagenstecher, Peterlein, Pfützner, Rausch, Renz, Richter, Rosenow, Rothmund, Röhm, Ruchholtz, Sahmland, Schäfer, Schieffer, Schmeck, Schu, Schütz, Seifert, Seitz, Sekundo, Sesterhenn, Sevinc, Sitter, Sommer, Steiniger, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wilhelm, Wulf, Wrocklage, Ziring

8.4 Lebenslauf

Persönliche Daten	
Name:	Lukas Heineck
Adresse:	Potsdamer Straße 10 35039 Marburg
Telefon:	01773372432
Geburtsdatum und -ort	20.07.1988 Berlin
Email:	Lukas.Heineck@rub.de
Schulbildung	
1995-1999	Grundschule Kerpen-Brüggen
1999-2007	Gymnasium der Stadt Kerpen, Europaschule
15. Juni 2007	Abitur am Gymnasium der Stadt Kerpen
Studium	
2007-2010	Studium der Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum Bachelorarbeit: „Protein-Interaktionen zwischen Ras-Mutanten und NORE“ Abschluss: **Bachelor of Science**, 30. September 2010
2010-2012	Studium der Molekularen Medizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena / Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn Masterarbeit: „Mannose Rezeptor-abhängige Kreuz-Präsentation *in vivo*“ Abschluss: **Master of Science**, 28. September 2012
2012-2013 (2019)	Promotion in Molekularer Biomedizin am Institut für Experimentelle Immunologie am Universitätsklinikum Bonn
2013-2019	Studium der Humanmedizin an der Phillips-Universität Marburg Abschluss: **2. Staatsexamen**, 12. April 2018

8.5 Danksagung

Mein wohl ewiger und immenser Dank gilt Dr. Lars Franken und Prof. Dr. Christian Kurts, die mir diese wohl einmalige Chance gegeben haben, meine Promotion medizinisch zu beenden und alles dafür getan haben mich immer zu unterstützen. Beide haben absolut altruistisch gehandelt und ich stehe bei beiden in absoluter Schuld, wofür ich mich, hoffe ich, irgendwann entsprechend revanchieren kann.

Zudem möchte ich einerseits Prof. Dr. Stefan Bauer auch noch ganz herzlich danken, der durch seine Korrekturzusage die medizinische Promotion realisiert hat und andererseits Prof. Dr. Jan Simon der mir die nötige Selbstdisziplin vermittelt hat.

Mein besonderer Dank gilt auch der Arbeitsgruppe im IMMEI, die mich immer tatkräftig in allen Belangen unterstützt hat und mir gezeigt hat, dass Forschung eine der wichtigsten Komponenten der Moderne sein sollte.

Ehrenwörtliche Erklärung:

„Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Der Einfluss von Rottlerin auf T-Zellpräsentation und –aktivierung“ im Institut für Immunologie unter Leitung von Prof. Dr. Stefan Bauer mit Unterstützung durch Prof. Dr. Kurts (Institut für Experimentelle Immunologie, Uniklinikum Bonn) ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ich versichere, dass ich sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate kenntlich gemacht habe.

Mit dem Einsatz von Software zur Erkennung von Plagiaten bin ich einverstanden.

Ort, Datum, Unterschrift Doktorandin/Doktorand

„Die Hinweise zur Erkennung von Plagiaten habe ich zur Kenntnis genommen.“

Ort, Datum, Unterschrift Referentin/Referent